

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



Facultad de Ciencias de la Salud

Carrera Profesional de Estomatología

**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***

Bach. Lysanne del Carmen Carranza Villaty

Asesora:

Ms. C.D. Lourdes Magdalena Yanac Acedo

Cajamarca – Perú

Octubre – 2020

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



Facultad de Ciencias de la Salud

Carrera Profesional de Estomatología

**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 presentada en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar por el
título profesional de cirujano dentista

Bach. Lysanne del Carmen Carranza Villaty

Asesora:

Ms. C.D. Lourdes Magdalena Yanac Acedo

Cajamarca – Perú

Octubre – 2020

COPYRIGHT © 2020 by

LYSANNE DEL CARMEN CARRANZA VILLATY

Todos los derechos reservados

A mis padres por su apoyo
incondicional, y motivación
constante a lo largo de mi vida.

A Dios, por guiarme y darme fortaleza para superar cada adversidad.

A la Ms. C.D. Lourdes Yanac, por acompañarme con su paciencia, consejos, recomendaciones y su constante asesoramiento a lo largo de esta investigación.

Al Dr. MBlgo. Jorge Bazán, por su valioso apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Q.F. Jessica Bardales y a Marilú, por su apoyo desinteresado en la elaboración de los extractos.

A mis familiares y amigos, que directa o indirectamente hicieron posible la elaboración de esta investigación.

RESUMEN

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) *in vitro*, se trabajó con 4 grupos donde: grupo 0 (“manzanilla”, “llantén”, “eucalipto”), grupo 1 (“manzanilla” + “llantén”), grupo 2 (“llantén” + “eucalipto”), y grupo 3 (“eucalipto” + “manzanilla”); en las concentraciones de 100%, 50%, 25% y 12,5%. El control positivo fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo alcohol de 96°.

Se usó el método de difusión de discos, con 10 repeticiones por grupo, los halos de inhibición en milímetros fueron registrados en el programa Microsoft Excel.

Para el análisis estadístico se usó el programa IBM SPSS 26, donde se construyó una base con los datos obtenidos. Se usaron las pruebas de normalidad de Kolmogorov – Smirnov y Shapiro - Wilk con un nivel de significancia del 5%. Para determinar las diferencias significativas se usaron pruebas paramétricas, de análisis de varianza y la prueba Tukey.

En la determinación de la prueba de susceptibilidad, se encontró efecto antibacteriano *in vitro* en el grupo n.º 2 al 100%, y en el extracto puro de *Eucalyptus globulus* al 100% sobre colonias de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), siendo sensibles (+) según la escala de Duraffourd. Los demás grupos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control positivo ($p > 0.05$), pero si respecto al grupo control negativo ($p < 0.05$).

Se concluyó que existen efecto inhibitorio sobre cepas de *Streptococcus mutans* en la combinación de *Eucalyptus globulus* y *Plantago major* al 100%; y en el extracto puro de *Eucalyptus globulus* al 100%.

Palabras clave: *Plantago major*, *Eucalyptus globulus*, *Matricaria chamomilla*, *Streptococcus mutans*, sinergismo farmacológico, *in vitro*.

ABSTRACT

In order to evaluate the synergistic effect of the combination of extracts from *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) and *Matricaria chamomilla* (manzanilla) in the inhibition of the growth of *Streptococcus mutans* strains (ATCC 25175) *in vitro*, we worked with 4 groups: group 0 (“manzanilla”, “llantén”, “eucalipto”), group 1 (“manzanilla” + “llantén”), group 2 (“llantén” + “eucalipto”), y group 3 (“eucalipto” + “manzanilla”); in the concentrations of 100%, 50%, 25% and 12.5%. The positive control was chlorhexidine at 0.12% and the negative control was 96° alcohol.

The disk diffusion method was used, with 10 repetitions per group, the inhibition halos in millimeters were registered in the Microsoft Excel program.

For the statistical analysis, the IBM SPSS 26 program was used, where a database was built with the obtained data. Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk normality tests were used with a significance level of 5%. To determine the significant differences, parametric tests, analysis of variance tests and the Tukey test were used.

In the determination of the susceptibility test, *in vitro* antibacterial effect was found in group No. 2 at 100%, and in the pure extract of *Eucalyptus globulus* at 100% on *Streptococcus mutans* colonies (ATCC 25175), being sensitive (+) according to Duraffourd's scale. The other groups didn't show significant differences with respect to the positive control group ($p > 0.05$), but did show significant differences with respect to the negative control group ($p < 0.05$).

It was concluded that there's an inhibitory effect on *Streptococcus mutans* strains in the combination of *Eucalyptus globulus* and *Plantago major* at 100%; and in the pure extract of *Eucalyptus globulus* at 100%.

Key words: *Plantago major*, *Eucalyptus globulus*, *Matricaria chamomilla*, *Streptococcus mutans*, sinergismo farmacológico, *in vitro*.

CONTENIDO

Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Contenido	viii
Lista de tablas	xiii
Lista de gráficos	xv
Lista de figuras	xvii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema de investigación	6
1.2. Justificación del problema de investigación	6
1.3. Objetivos	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos	7
1.4. Hipótesis de la investigación.....	8
CAPÍTULO II. MARCO CONCEPTUAL	9
2.1. <i>Streptococcus mutans</i>	10
2.1.1. Definición.....	10

2.1.2. Especies.....	10
2.1.3. Papel en la caries dental	10
2.2. Medicina natural	11
2.3. <i>Matricaria chamomilla</i>	11
2.3.1. Nombre científico.....	11
2.3.2. Familia	11
2.3.3. Descripción	11
2.3.4. Hábitat.....	12
2.3.5. Partes utilizadas de la planta	12
2.3.6. Propiedades	12
2.3.7. Sobre <i>Streptococcus mutans</i>	12
2.4. <i>Plantago major</i>	12
2.4.1. Descripción	12
2.4.2. Hábitat.....	12
2.4.3. Partes utilizadas de la planta	12
2.4.4. Propiedades	13
2.4.5. Usos en la cavidad oral	13
2.4.6. Sobre <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.5. <i>Eucalyptus globulus</i>	13
2.5.1. Nombre científico.....	13
2.5.2. Familia	13
2.5.3. Descripción	13

2.5.4. Hábitat.....	14
2.5.5. Componentes.....	14
2.5.6. En odontología	14
2.5.7. Sobre <i>Streptococcus mutans</i>	14
2.6. Sinergia de plantas medicinales	14
2.7. Antecedentes	15
2.7.1. A nivel internacional	15
2.7.2. A nivel nacional	19
2.8. Definición de términos básicos	27
2.8.1. Halo de inhibición	27
2.8.2. Escala de Duraffourd.....	27
2.8.3. Extracto hidroalcohólico	27
CAPÍTULO III. MÉTODOS	28
3.1. Tipo de investigación	28
3.2 Unidad de análisis, universo y muestra.....	28
3.2.1. Universo.....	28
3.2.2. Población	28
3.2.2.1. Criterios de selección.....	28
3.2.3. Unidad de análisis	28
3.2.4. Unidad de muestreo	29
3.2.5. Unidad de observación.....	29
3.2.6. Tamaño muestral.....	29

3.3. Métodos de investigación.....	29
3.4. Técnica de investigación.....	29
3.5. Instrumentos.....	29
3.6. Técnica de análisis de datos	30
3.7. Aspectos éticos de la investigación.....	30
3.8. Proceso.....	31
3.8.1. Sitio de investigación.....	31
3.8.2. Obtención y preparación de las plantas.....	31
3.8.3. Obtención de los extractos hidroalcohólicos	32
3.8.4. Procedimiento para determinación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	33
3.8.5. Susceptibilidad <i>in vitro</i> a antibacterianos	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Resultados	39
Discusión.....	42
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	47
Conclusiones	47
Recomendaciones.....	48
REFERENCIAS.....	49
ANEXOS.....	56

Anexo 1. Certificado de la elaboración de la parte experimental del estudio, por el Centro de Investigaciones Biomédicas (InvBiomed S.R.L.)	56
Anexo 2. Protocolo: Efecto sinérgico de combinación de extractos de “manzanilla”, “llantén” y “eucalipto” sobre <i>Streptococcus mutans</i>	57
Anexo 3. Certificación de cepa estandarizada <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) obtenida del laboratorio GenLab - Lima, Perú.....	58
Anexo 4. Protocolo de activación de la cepa <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) ...	59
Anexo 5. Flujograma del fundamento de difusión en disco, según Kirby Bauer	60
Anexo 6. Test de difusión en agar con discos, diámetros de halos de inhibición de colonias de la cepa <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) según diferentes concentraciones de los extractos	61
Anexo 7. Matriz de consistencia	63
Anexo 8. Tablas	66
Anexo 9. Gráficos	72
Anexo 10. Figuras	77

Lista de tablas

Tabla 1 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> en concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100%) de la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); y <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	64
Tabla 2 Efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> en concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100%) de los extractos de <i>Plantago major</i> (llantén), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) y <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	64
Tabla 3 Diámetro de halo de inhibición según la escala de Duraffourd para extractos en combinación	65
Tabla 4 Diámetro de halo de inhibición según la escala de Duraffourd para extractos puros.....	65
Tabla 5 ANOVA del efecto sinérgico <i>in vitro</i> de la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	66
Tabla 6 ANOVA del efecto sinérgico <i>in vitro</i> de la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	66
Tabla 7 ANOVA del efecto sinérgico <i>in vitro</i> de la combinación del extracto de <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	66
Tabla 8 ANOVA del efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	67

Tabla 9 ANOVA del efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> del extracto de <i>Plantago major</i> (llantén), sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	67
Tabla 10 ANOVA del efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> del extracto de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto), sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	67
Tabla 11 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para <i>Matricaria chamomilla</i>	68
Tabla 12 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para <i>Plantago major</i>	68
Tabla 13 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para <i>Eucalyptus globulus</i>	68
Tabla 14 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para <i>Matricaria chamomilla</i> + <i>Plantago major</i>	69
Tabla 15 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk <i>Matricaria chamomilla</i> + <i>Eucalyptus globulus</i>	69
Tabla 16 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para <i>Eucalyptus globulus</i> + <i>Plantago major</i>	69

Lista de gráficos

Gráfico 1 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> en concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100%) de la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); y <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	40
Gráfico 2 Efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100% y C+) según los extractos de <i>Plantago major</i> (llantén), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) y <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	41
Gráfico 3 Efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	70
Gráfico 4 Efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> del extracto de <i>Plantago major</i> (llantén), sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	70
Gráfico 5 Efecto inhibitorio del crecimiento <i>in vitro</i> del extracto de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto), sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	70
Gráfico 6 Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> a la concentración 12,5% de los extractos de <i>Plantago major</i> (llantén), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) y <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	71
Gráfico 7 Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> a la concentración 25% de los extractos de <i>Plantago major</i> (llantén), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) y <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	71
Gráfico 8 Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> a la concentración 50% de los extractos de <i>Plantago major</i> (llantén), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) y <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	71
Gráfico 9 Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> a la concentración 100% de los extractos de <i>Plantago major</i> (llantén), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) y <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) sobre cepas <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	71
Gráfico 10 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> de la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> y <i>Plantago major</i> ; en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	72

Gráfico 11 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> de la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> y <i>Eucalyptus globulus</i> ; en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	72
Gráfico 12 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> de la combinación del extracto de <i>Plantago major</i> y <i>Eucalyptus globulus</i> ; en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	72
Gráfico 13 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> en la concentración de 12,5% según lo combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)...	73
Gráfico 14 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> en la concentración de 25% según lo combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	73
Gráfico 15 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> en la concentración de 50% según lo combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	74
Gráfico 16 Efecto sinérgico <i>in vitro</i> en la concentración de 12,5% según la combinación del extracto de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Plantago major</i> (llantén); <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); <i>Plantago major</i> (llantén) y <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	74

Lista de figuras

Figura 1	Flujograma de obtención de extractos hidroalcohólicos	75
Figura 2	Recolección de las plantas. A. "Llantén" en el distrito de Jesús, Cajamarca B. "Eucalipto" en el centro poblado Otuzco, Cajamarca C. "Manzanilla" en el distrito de Namora, Cajamarca.....	82
Figura 3	Secado de 500 g de cada planta, en estufa a 56° por 72 horas	82
Figura 4	Pulverización de cada planta en mortero y.....	82
Figura 5	Método por agitación constante, 300 revoluciones/minuto por 24 horas A. <i>Eucalyptus globulus</i> B. <i>Matricaria chamomilla</i> C. <i>Plantago major</i>	82
Figura 6	Filtrado de cada extracto	82
Figura 7	Pesado de 4,2 g de agar Mueller–Hinton (marca Merck KGaA) con 200 mL de agua destilada	82
Figura 8	Cepa estandarizada <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).....	82
Figura 9	Incubación de la cepa <i>S. mutans</i> por 15 minutos a 36 °C ± 1 °C.....	82
Figura 10	Sembrado de cepa <i>S. mutans</i> en agar sangre de carnero desfibrinada (5%).....	82
Figura 11	Incubación en condiciones de microaerofilia a 36 °C ± 1 °C, durante 24 horas	82
Figura 12	Cultivo de <i>S. mutans</i> luego de 24 horas de incubación.....	82
Figura 13	Colocación de colonias de la cepa <i>S. mutans</i> en 4 mL de caldo Mueller-Hinton	82
Figura 14	Turbidez final de 0,5 en la escala McFarland	82
Figura 15	A. Preparación de las diluciones B. Dilución de extractos puros C. Dilución de extractos combinados D. Diluciones al 100%, 50%, 25%, 12,5% de extractos puros y en combinaciones.....	82
Figura 16	Impregnación de 50 µL de cada extracto, en las diferentes diluciones	82
Figura 17	Inoculación de la superficie de las placas de Petri conteniendo agar sangre, por rayado con el hisopo en tres direcciones con rotaciones de 60° aproximadamente, y sobre los bordes del agar como paso final.....	82
Figura 18	Colocación de los discos impregnados en extractos sobre las placas de Petri	82
Figura 19	Placas invertidas en ambiente de microaerofilia para incubación a 35 °C ± 1 °C durante 24 horas (Incubadoras Memmert).....	82
Figura 20	Placas de Petri luego de 24 horas en incubación.....	82

Figura 21 Halos de inhibición: A. Control positivo, B. Control Negativo, C. *Eucalyptus globulus* al 100%; D. Combinación de *Eucalyptus globulus* y *Plantago major* al 100%82

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La caries dental es la enfermedad más prevalente, según el Ministerio de Salud (MINSA); desde los 5 años de edad, siendo los problemas de la cavidad oral la principal causa de consulta en los establecimientos de salud del MINSA. Este, comparó en 2017 los resultados de dos estudios nacionales de salud bucal realizados por este mismo, el primero fue en 2001-2002 y el segundo en 2012-2014; donde el primer estudio en dentición permanente reveló una prevalencia de 60,4% y en el segundo disminuyó a 57,6%, mientras que, en la dentición mixta, el primer estudio obtuvo una prevalencia de 90,4% y en el segundo disminuyó a 85,6%.⁽¹⁾

Es una enfermedad multifactorial causada por un desequilibrio en la flora oral por la presencia de carbohidratos fermentables en un determinado tiempo; resulta de un proceso dinámico de daño y restitución de la materia dental, se modula por muchos factores como el tipo de flora microbiana, dieta, higiene bucal, genética, anatomía dental, composición del esmalte y dentina, uso de fluoruros, composición y flujo salival, y capacidad de amortiguación.⁽²⁾

Existen tres hipótesis respecto a la etiología de esta enfermedad: la hipótesis de ‘la placa específica’, la hipótesis de ‘la placa no específica’ y la hipótesis de ‘la placa ecológica’. La primera propone que pocas especies de la microflora total están activamente involucradas, principalmente *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilos spp.* La segunda propone que es consecuencia de la interacción de todos los grupos de bacterias dentro de la placa.⁽³⁾

La teoría más aceptada que explica la predisposición del individuo a la enfermedad de caries, y la interacción del biofilm en este proceso es la denominada ‘Teoría de

Placa Ecológica' ⁽⁴⁾, la cual pretende explicar la transición de una microflora oral no patógena hacia una patógena con el huésped, y reconocer las interrelaciones que existen en la placa dental desarrollando estrategias para mantener el equilibrio ecológico del biofilm. Cuando hay un aumento de los carbohidratos fermentables se desencadenan condiciones ácidas, las cuales interrumpen las interacciones microbianas que controlan el equilibrio de las comunidades microbianas en la cavidad oral, comenzando el proceso de la enfermedad de caries dental.⁽⁵⁾

El biofilm es un consorcio de microorganismos que se adhieren a la superficie de un diente.⁽⁶⁾ De otro modo se entiende como una comunidad microbiana agrupada en colonias, organizada, proliferante, de mutua cooperación, y enzimáticamente activa que coloniza las superficies dentales y los tejidos blandos que los rodean.⁽⁴⁾

Evidencia actual muestra que el microbiota bucal natural tiene una relación simbiótica con el anfitrión, y ofrece ventajas en la cavidad oral. No obstante, la simbiosis puede ser perturbada y puede ocurrir la disbiosis. Por lo que debemos centrar el cuidado oral en controlar los factores que desencadenan esta disbiosis, pero manteniendo el microbiota.⁽⁴⁾ La microflora de la caries dental está dominada principalmente por bacterias gram-positivas.⁽⁷⁾

Estudios aislaron diferentes especies microbianas de la cavidad oral para ver su relación con el desarrollo de las lesiones cariosas, dentro de las cuales, las que respondieron a este fueron las especies de *Streptococcus spp.*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterium* y *Veillonella*.⁽⁸⁾

Las especies bacterianas acidogénicas - acidúricas más relevantes hasta la fecha son *Streptococcus mutans* (iniciadores de la enfermedad), *Bifidobacterium spp*, y *Lactobacill acidophilus* (potenciadores del progreso de la enfermedad).^{(9) (10)}

El *Streptococcus mutans* es una bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa, y es el microorganismo más estudiado en investigaciones sobre la caries dental. Es un factor de riesgo cariogénico, esto por su capacidad acidogénica y acidúrica; por lo que muchas medidas preventivas y de tratamiento están enfocadas a este.⁽¹¹⁾

Representa hasta el 80% del número total de microorganismos que participan en la colonización primaria de la cavidad oral, y se puede encontrar como coco o de forma más alargada.⁽¹²⁾

Aunque *S. mutans* no actúa como agente único en el desarrollo de la caries dental, estudios han demostrado que llega a alterar el medio, formando un medio rico en polisacáridos extracelulares en pH bajo, creando así un ambiente favorable para que prosperen otras especies acidógenas y acidúricas, responsable también de la caries dental.⁽¹³⁾

El uso de prácticas complementarias para intentar mejorar la salud es tan antiguo como la aparición de los seres humanos, el hombre desde su origen ha mantenido una estrecha relación con los recursos naturales. Las plantas son los recursos más usados por su disponibilidad, se usan en distintas formas de preparación, para tratar o prevenir diferentes tipos de dolencias. El conocimiento científico de ciertas especies es aún inexplorado y es preciso que se empiece a indagar sobre estas.⁽¹⁴⁾

A la fecha, el 10% de las plantas a nivel mundial se usan con fines medicinales, siendo 50 000 especies aproximadamente.⁽¹⁴⁾ El Perú es un país megadiverso,

ubicado entre los 17 países con mayor variedad biológica en el mundo, con un aproximado de 20 533 especies de flora.⁽¹⁵⁾

Con el objetivo de fundamentar, mediante el integro rigor científico, la utilización de las plantas medicinales, la Organización Mundial de Salud desde 1976 fomenta y financia planes de desarrollo, como parte de los programas de Atención Primaria de Salud (APS), para la utilización de formas apropiadas de los sistemas tradicionales de medicina.⁽¹⁶⁾

Los beneficios de estas plantas medicinales se dan gracias a los metabolitos secundarios, los cuales les permiten producir y acumular compuestos de naturaleza química diferente como: terpenos, alcanoides, glucósidos cianogénicos, ciclitoles, aceites esenciales, fenoles, taninos, etc. La síntesis de estos depende de la etapa de desarrollo de las plantas, son importantes porque forman parte de la respuesta de defensa de estas.⁽¹⁷⁾

El *Plantago major* es una hierba medicinal antigua, que se introdujo hace 4000 años aproximadamente en países nórdicos, posee innumerables efectos farmacológicos, y tiene componentes químicos como; vitaminas, enzimas, mucílagos, flavonoides, taninos, aucubina, ácidos orgánicos; que le dan sus propiedades medicinales.⁽¹⁸⁾

Estudios como los de Eduardo⁽¹⁹⁾, Choque⁽²⁰⁾, Borja⁽²¹⁾, Rivera⁽²²⁾, Reina⁽²³⁾, Alvarado⁽²⁴⁾ y Gontijo⁽²⁵⁾, demostraron su poder antibacteriano sobre bacterias de importancia estomatológica como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* a nivel *in vitro*; así mismo Martínez⁽²⁶⁾ indica que tiene toxicidad baja en animales y en células humanas.

La introducción del *Eucalyptus spp* data del siglo XVIII donde se empezó a usar en la fisioterapia occidental. Su principal componente es el eucaliptol, de 75% a 85%, quien le da propiedades bacteriostáticas, bactericidas y fungicidas.⁽²⁷⁾

Estudios como los de Cahuana⁽²⁸⁾, Vela⁽²⁷⁾, Meléndez⁽²⁹⁾, Alvarado⁽³⁰⁾, Landeo⁽³¹⁾, Juscamaita⁽³²⁾, Takarada⁽³³⁾, Chandra⁽³⁴⁾, Chaudhari⁽³⁵⁾ y Coswing⁽³⁶⁾ demostraron su poder antibacteriano sobre bacterias como *Streptococcus mutans*, *S. aureus* y *S. sobrinus*, relacionadas con la enfermedad de caries dental; en *Fusobacterium nucleatum* y *P. gingivalis*, relacionadas con enfermedades periodontales. Rojas⁽³⁷⁾ indica que no tiene toxicidad en células mamíferas.

La *Matricaria chamomilla* es una planta con propiedades antibacterianas, antiinflamatoria, antifúngica y antiulcerígena, demostrada en especies como: *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus epidermis* y *Candida albicans*, entre otras.⁽³⁸⁾ Estudios como los de Romero⁽³⁹⁾, Borja⁽²¹⁾, Andonayre⁽³⁸⁾, Jáuregui⁽⁴⁰⁾, Acuña⁽⁴¹⁾, Cosco⁽⁴²⁾, Choque⁽²⁰⁾ demostraron su eficacia antibacteriana sobre bacterias de importancia estomatológica como *Streptococcus mutans* y *P. gingivalis*; su poder antibacteriano *in vivo* en la placa bacteriana. Macedo⁽⁴³⁾ demostró que no muestra actividad citotóxica.

Determinadas poblaciones tienen capacidad económica reducida, por lo que no es fácil que tengan acceso a medicamentos, motivo por el cual siguen usando la medicina tradicional mediante el uso de sustancias procedentes de plantas medicinales.⁽⁴⁴⁾

1.1. Formulación del problema de investigación

¿Cuál es 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) *in vitro*?

1.2. Justificación

Actualmente el principal problema es que, debido al consumo indiscriminado de fármacos, muchas bacterias han comenzado a mostrar resistencia. Intentando buscar soluciones a esto cada vez hay más investigaciones que buscan encontrar los beneficios médicos de determinadas plantas sobre la cavidad oral, y que tengan el menor efecto tóxico.

Con respecto al problema de investigación es importante porque proporciona una línea de investigación para futuros estudios *in vitro* y hasta clínicos; los cuales ayuden a seguir investigando sobre estos fitofármacos, que logran combatir la inhibición en sinergia del crecimiento de *Streptococcus mutans* en el proceso de la caries dental, siendo está a nivel mundial, una de las enfermedades de mayor prevalencia.

Tiene proyección social, porque se desarrollará con diversas plantas de la región, lo que permitiría un mejor uso y recurso económico de estas para la ciudad.

Las plantas seleccionadas para esta investigación fueron: *Plantago major*, *Eucalyptus globulus* y *Matricaria chamomilla*, con la obtención de diferentes concentraciones, se logró llevar a cabo una investigación viable y posible, que buscó probar el efecto sinérgico de estas plantas sobre cepas de *S. mutans in vitro*,

para beneficio de las personas interesadas en este ámbito de la medicina alternativa, y será beneficioso para estudiantes que quieran seguir investigando al respecto.

Se fortalece su valor dada la limitación de investigaciones científicas en esta área en la región; siendo la primera a nivel regional y una de las pocas a nivel nacional que busca demostrar el efecto sinérgico que tienen estos fitofármacos sobre *Streptococcus mutans*.

Así mismo, se busca ofrecer una alternativa de elección en la inhibición de cepas de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral, ya que es una de las bacterias predominantes en la fase inicial de la caries dental; en consecuencia, poder tener una alternativa tanto en la prevención como en el tratamiento de esta enfermedad.

1.3. Objetivos

1.3.1. General: 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) *in vitro*.

1.3.2. Específicos:

- Determinar el efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* de los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) a diferentes concentraciones (100%, 50%, 25% y 12,5%) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).
- Determinar y comparar el efecto sinérgico *in vitro* de la combinación de los extractos de *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus*

(eucalipto); *Plantago major* (llantén) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla); *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla); a diferentes concentraciones (100%, 50%, 25% y 12,5%) en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

1.4. Hipótesis de la investigación

- H_a: El efecto sinérgico de la combinación de extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) no posee mejor efecto inhibitorio frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) a bajas concentraciones, *in vitro*.
- H_o: El efecto sinérgico de la combinación de extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) posee mejor efecto inhibitorio frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) a bajas concentraciones, *in vitro*.

CAPÍTULO II. MARCO CONCEPTUAL

Las enfermedades de mayor prevalencia que encontramos en la cavidad oral son la caries dental y enfermedades periodontales; las cuales, si no se tratan apropiadamente y a tiempo, pueden ocasionar la pérdida de los órganos dentales, trayendo como consecuencia alteraciones: estéticas, maloclusiones, digestivas, entre otras.⁽⁴²⁾

La Organización Europea de investigación de la caries (ORCA) y el Grupo de investigación de cariología (CRG) de la Asociación internacional de investigación dental (IADR) en 2019, en Alemania, llegaron a un consenso sobre las definiciones de los términos usados en cariología, donde definieron a la caries dental como una enfermedad multifactorial, no transmitible, mediada por biología, factores conductuales, psicosociales y ambientales; que resulta en la pérdida mineral de los tejidos duros dentales.⁽⁶⁾

La Federación Dental Internacional (FDI) indica que es la enfermedad crónica más extendida alrededor del mundo, y la define como una enfermedad multifactorial, causada por la interacción entre la superficie del diente, el biofilm bacteriano y la presencia de azúcares en la dieta; donde las bacterias del biofilm metabolizan los azúcares y producen ácidos, los cuales desmineralizan el esmalte.⁽⁴⁵⁾

Se ha estudiado la etiología de la caries durante varios años. Los factores de riesgo que la originan son múltiples, entre los que tenemos: factores biológicos, ambientales y de comportamiento, donde si un factor está presente, aumenta directamente la probabilidad a la enfermedad, mientras que su ausencia o la remoción del factor, reduce la probabilidad de que se dé.⁽⁴⁶⁾

El microbiota oral es uno de los ecosistemas microbianos más antiguos en ser reconocido, su descripción inicia en el año 1863 cuando Van Leeuwenhoek observó en el microscopio, por primera vez, a estos microorganismos en placas dentales.⁽⁴⁷⁾

2.1. *Streptococcus mutans*

En la actualidad, el *Streptococcus mutans* es el agente acidogénico y acidúrico más predominante en la formación de la caries dental, ya que causa una desmineralización en los órganos dentarios.^{(38) (48)}

2.1.1. Definición: El *Streptococcus mutans* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa. Su potencial cariogénico se debe a tres aspectos: capacidad de sintetizar grandes polímeros a partir de la sacarosa ayudando a la colonización de estructuras duras; su acidogenicidad, y su aciduricidad. Además, es una bacteria acidófila, se desarrolla perfectamente en medios ácidos.⁽⁴⁹⁾

2.1.2. Especies: Se han diferenciado más de 16 especies de la familia de *Streptococcus*, siendo las más frecuentes: *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.⁽⁴⁷⁾

Estudios experimentales hechos en animales concluyen que la caries dental no es inducida por una sola especie bacteriana, sin embargo, destacan que las bacterias cariogénicas más agresivas son *Streptococcus mutans* y *Lactobacill spp.*⁽⁵⁰⁾

2.1.3. Papel en la caries dental: La capacidad que posee el *Streptococcus mutans* para adaptarse a cambios ambientales repentinos y sustanciales dentro de la placa dental es un atributo clave que contribuye a que se le considere como el principal agente etiológico iniciador de esta enfermedad, además que posee múltiples

adhesinas de superficie las cuales permiten la colonización incluso en ausencia de sacarosa.⁽¹³⁾

2.2. Medicina natural

La práctica de la medicina natural se basa en usar plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas, para tratar o prevenir enfermedades, usando extractos de estas en diferentes maneras de preparación.⁽⁵¹⁾

Recientemente, la medicina natural, ha recibido mayor interés de los científicos, puesto que han comprobado las propiedades que tienen sus componentes.⁽⁴²⁾

Aunque las hierbas y los fármacos son considerados opuestos, un estudio del Instituto Nacional de Cáncer indica que el 67% de los fármacos tiene su origen en la naturaleza, y que el 25% derivan de las plantas.⁽⁵¹⁾

2.3. *Matricaria chamomilla*

2.3.1. Nombre científico: *Matricaria chamomilla* L.⁽⁵²⁾

2.3.2. Familia: Asteraceae (Compositae)⁽⁵²⁾

2.3.3. Descripción: La *Matricaria chamomilla* conocida comúnmente como “manzanilla”, es una planta herbácea, de tallo cilíndrico, erguido, ramoso, de hasta 50 cm de altura. Sus flores son fragantes, desprenden un olor característico a manzana, de ahí el nombre “manzanilla”. Crece en cultivos de tierra, en terrenos arenosos y también en baldíos.⁽⁵³⁾

2.3.4. Hábitat: Es nativa de la región de los Balcanes, desde donde se difundió en Europa. Crece con facilidad en suelo bien drenado, se adapta a diferentes climas, aunque su mejor calidad se obtiene en clima templado-cálido, entre 15 y 23 °C.⁽⁵³⁾

2.3.5. Partes utilizadas de la planta: Cabezas florales, ricas en flavonoides.⁽⁵⁴⁾

2.3.6. Propiedades: Se utiliza ampliamente en la medicina alternativa debido a sus propiedades antiinflamatorias, analgésica, antibacterianas, bacteriostáticas, antioxidantes, cicatrizantes y antifúngicas.⁽⁵⁵⁾

2.3.7. Sobre *Streptococcus mutans*: Se ha usado a la *Matricaria chamomilla* “manzanilla” sobre el *Streptococcus mutans*, por sus conocidas propiedades antibacterianas, usándola tanto en aceites esenciales como en extractos, a diferentes concentraciones a nivel *in vitro*; así mismo sobre la placa bacteriana como enjuague bucal a nivel *in vivo*.⁽⁵⁶⁾

2.4. *Plantago major*

2.4.1. Descripción: Conocido comúnmente como “llantén”. Tiene un tallo corto; hojas anchas ovaladas, que suelen tener unos 15 a 30 cm de diámetro y de 5 a 20 cm de largo, con cinco a nueve venas prominentes en cada hoja; sus flores son de color marrón verdoso y pequeñas; y tiene pequeñas semillas de forma ovalada.⁽⁵⁷⁾

2.4.2. Hábitat: Se encontró por primera vez en el norte de Europa y en Asia central, y ahora está ampliamente dispersa por todo el mundo. Suele crecer en áreas con suelo compactado como en los bordes de los caminos. Es fertilizado por el viento y se propaga por sus semillas.⁽⁵⁷⁾

2.4.3. Partes utilizadas de la planta: Prácticamente se utiliza toda la planta, sus semillas, flores, hojas y raíces; ya que estas contienen variedad de compuestos

bioactivos como flavonoides, alcaloides, ácidos grasos, polisacáridos compuestos fenólicos, terpenoides, glucósidos iridoides, y vitaminas; las bioactividades del *Plantago major* se atribuyen a estos componentes químicos.⁽⁵⁷⁾

2.4.4. Propiedades: Antiinflamatorias: las hojas contienen sustancias como baicaleína, aucubina, ácido ursólico y ácido oleanólico. Astringente: contiene taninos; adecuados para detener la diarrea. Hemostática y cicatrizantes: regenera células epidérmicas y aumenta la hemostasia. Antibacterianas: la aucubigemina, es el compuesto más resaltante ya que se cree que es el responsable de la actividad antibacteriana de la planta; esto porque desnaturaliza las proteínas de algunos microorganismos, la acteosida también le da estas propiedades.⁽⁵⁸⁾

2.4.5. Usos en la cavidad oral: Por sus propiedades antiinflamatorias para tratar enfermedades tales como gingivitis y aftas.⁽⁵⁹⁾

2.4.6. Sobre *Streptococcus mutans*: Hay estudios científicos que aseguran que esta planta muestra actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus acidophilus*, en diferentes presentaciones como aceites esenciales o extractos hidroalcohólicos.⁽²²⁾

2.5. *Eucalyptus globulus*

2.5.1. Nombre Científico: *Eucalyptus globulus* Labill⁽⁶⁰⁾

2.5.2. Familia: Myrtaceae⁽⁶⁰⁾

2.5.3. Descripción: Es un árbol de gran desarrollo; de corteza color gris; que alcanza alturas de 100 m. Sus hojas son dimorfas, con fuerte olor a cineol, de color verde; de 10 a 20 cm de largo, contienen 4% de aceite esencial, con olor balsámico, y es un gran desinfectante natural.⁽²⁷⁾

2.5.4. Hábitat: Es un árbol grande originario del sureste de Australia, y del sudeste y sur de Tasmania. Es una especie exótica, se comenzó a plantar a finales del siglo XIX en el resto del mundo.⁽⁶⁰⁾

2.5.5. Componentes: El principal es el eucaliptol que está en un 75% a 85% en el aceite esencial, el cual da propiedades bacteriostáticas, bactericidas y fungicidas. Además, posee terpenos y alcoholes como el pineno, canfeno, terpinol y eugenol; además acetonas y aldehídos.⁽²⁷⁾

2.5.6. En odontología: Está presente en los componentes de los colutorios, en pastas dentales como antiséptico, y en gomas de mascar para la halitosis causada por invasión bacteriana.⁽²⁷⁾

2.5.7. Sobre *Streptococcus mutans*: El “eucalipto” posee propiedades antimicrobianas, se usa como agente preventivo frente al *Streptococcus mutans* intentando disminuir el índice de caries oral, en forma de extractos hidroalcohólicos y como aceites esenciales a diferentes concentraciones.⁽²⁷⁾

2.6. Sinergia en plantas medicinales

Antiguamente los sanadores tradicionales, en su afán por descubrir remedios eficaces para curar ciertas enfermedades comenzaron a combinar diferentes extractos de plantas medicinales, lo que muestra un campo amplio para realizar investigaciones que comprueben propiedades beneficiosas con el menor o nulo efecto tóxico. Existen numerosos estudios sobre plantas medicinales y sus efectos, pero la gran mayoría las estudia individualmente.⁽²¹⁾

Así como las plantas medicinales poseen amplias propiedades beneficiosas para el ser humano al ser terapéuticas, también poseen reacciones adversas que pueden desencadenar intoxicaciones si no se emplean en las dosis o períodos adecuados; de

ahí que esta línea de investigación es importante para que su uso sea científicamente eficaz y seguro.⁽⁵¹⁾

2.7. Antecedentes

2.7.1. A nivel internacional:

Reina *et al.* en el año 2013, en Estados Unidos, realizaron el estudio “The effects of *Plantago major* on the activation of the neutrophil respiratory burst” el cual tuvo como objetivo determinar efectos del extracto de *P. major*, y sus principales compuestos baicaleína (actividad antioxidante y antiinflamatoria), y aucubina (actividad antibacteriana), en neutrófilos humanos. Para lo cual prepararon el “llantén” en etanol; y sus compuestos en dimetilsulfóxido. Obtuvieron como resultado que el “llantén” no fue tóxico para las células en ninguna concentración. Concluyeron que el *P. major* no es tóxico sobre células de neutrófilos humanos, y posee efecto antioxidante, antibacteriano y antiinflamatorio.⁽²³⁾

Macedo *et al.* en el año 2012, en Cuba, realizaron el estudio *in vivo* titulado “Efectos citotóxico, genotóxico y mutagénico *in vivo* de la tintura de *Matricaria chamomilla* L.” el cual tuvo como objetivo evaluar la actividad citotóxica, genotóxica y mutagénica *in vivo* de la tintura de “manzanilla” en médula ósea de roedores. La tintura fue comercial a 20mg/mL y 64% de alcohol, administrada por sonda 5 días. Obtuvieron como resultado que no hubo efecto citotóxico ni mutagénico en 100 gotas diarias. Concluyeron que la tintura de *M. chamomilla* cuando se administra en concentraciones de 0,02 e 0,1 μ L por gotas diarias, no muestra toxicidad.⁽⁴³⁾

Chandra *et al.* en el año 2016, en la India, realizaron el estudio “Antimicrobial efficacy of the combinations of *Acacia nilotica*, *Murrayakoenigii* (Linn.) Sprengel,

Eucalyptus, and *Psidiumguajava* on primary plaque colonizers: An *in vitro* study”, el cual tuvo como objetivo evaluar la eficacia antimicrobiana de combinaciones dobles de “goma arábica”, “árbol del curry”, “eucalipto” y “guayabo” en colonizadores de placas primarias *in vitro*. Diluyeron los extractos secos de cada planta con dimetilsulfóxido (100 mg/mL), luego hicieron combinaciones dobles de estas. Obtuvieron como resultado que la combinación de “goma arábica” y “guayabo” fue significativamente mayor con un halo de inhibición de 21,08 mm ± 2,11 mm contra *S. mutans*. Concluyeron que todas las combinaciones tenían efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*.⁽³⁴⁾

Borja en el año 2017, en Ecuador, realizó el estudio “Efecto inhibitorio del extracto de “manzanilla” (*Matricaria chamomilla*), extracto de “llantén” (*Plantago major*) y la combinación del extracto de “manzanilla” y “llantén” comparado con la clorhexidina sobre cepa de *P. gingivalis*” el cual tuvo como objetivo demostrar el efecto inhibitorio del extracto de “manzanilla”, “llantén” y su combinación sobre *P. gingivalis*. Realizó 30 cultivos bacterianos, donde el control positivo fue clorhexidina al 0,12%. Obtuvo como resultados que la “manzanilla” mostró halos de inhibición de 10,20mm, “llantén” de 12,47mm, la combinación 16,57mm, y el control positivo 17,60mm. Concluyó que el efecto sinérgico de los extractos posee el mayor efecto inhibidor, siendo estadísticamente similar al control positivo.⁽²¹⁾

Arteaga *et al.* en el año 2017, en Cuba, realizaron el estudio *in vivo* “Efectividad del gel de “manzanilla” y “llantén” como terapia coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica” el cual tuvo como objetivo evaluar la efectividad del gel de “manzanilla” al 5% y “llantén” al 2% en el tratamiento de la periodontitis crónica. El gel tuvo extractos de las plantas y jalea de carbonero, como excipiente;

la muestra fue de 40 pacientes, quienes usaron el gel por 5 semanas. Obtuvieron como resultado que a los 18 días todos los pacientes presentaron mejoría clínica y ausencia de sangrado, mayor mejoría en el grupo experimental. Concluyeron que el gel de “manzanilla” y “llantén” presentó resultados altamente satisfactorios.⁽⁶¹⁾

Gontijo *et al.* en el año 2006, en Brasil, realizaron el estudio “Análisis farmacognóstico y actividad antibacteriana de extractos de plantas utilizados en la formulación de higiene bucal” el cual tuvo como objetivo desarrollar un enjuague bucal con extractos hidroalcohólicos de “romero”, “llantén”, “lapacho rosado”, “milenrama” y “berro”; evaluar su composición farmacognóstica y su acción antibacteriana. Usaron el método de difusión en discos, con 50 µL cada uno. Obtuvieron como resultados que el enjuague fue capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias, y que las más sensible fueron *S. aureus* y *B. subtilis*. Concluyeron que los extractos hidroalcohólicos, incluido el de “llantén”, presentaban actividad antibacteriana en especial en bacterias Gram-positivas.⁽²⁵⁾

Chaudhari *et al.* en el año 2012, en la India, realizaron el estudio “Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*”, el cual tuvo como objetivo demostrar la actividad antibacteriana de aceites esenciales comerciales contra *S. mutans in vitro*. Los aceites esenciales fueron: “gaulteria”, “lima”, “menta verde”, “canela”, “menta”, “cedro”, “clavo”, “hierba de limón”, y “eucalipto”, usaron el método de difusión de discos en agar sangre. Obtuvieron como resultado que el aceite de “canela” mostró la mayor actividad, mientras que los aceites “gaulteria”, “lima”, “menta” y “menta verde” no mostraron actividad. Concluyeron los aceites de “canela”, “hierba de limón”, “madera de cedro”, “clavo” y “eucalipto” tienen propiedades antibacterianas en *S. mutans*.⁽³⁵⁾

Coswing *et al.* en el año 2014, en Brasil, realizaron el estudio “Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*”, el cual tuvo por objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de ambos aceites en *S. mutans*. Utilizaron método de difusión de discos y determinaron la concentración mínima inhibitoria. Obtuvieron como resultados que los esenciales presentaban halos de inhibición entre $14,7 \pm 1,2$ mm y $35,3 \pm 0,34$ mm, en sinergia mostraban un halo de 42 mm, y que *E. globulus* mostró mejores efectos con un halo de 34 mm. Concluyeron que ambos aceites tienen propiedades antimicrobianas sobre *S. mutans*, con buen efecto en sinergia, y que *E. globulus* mostró superioridad frente a *E. urograndis*.⁽³⁶⁾

Takarada *et al.* en el año 2004, en Japón, realizaron el estudio “Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens”, el cual tuvo como objetivo comparar la eficacia antibacteriana de aceites esenciales contra patógenos orales. Probaron el efecto antibacteriano de aceites esenciales de “manuka”, de “árbol de té”, de “eucalipto”, de “lavándula” y de “romarino” en las bacterias orales: *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *S. mutans* y *S. sobrinus*, obteniendo como resultado que las bacterianas usadas se destruyeron completamente al ser expuestas por 30 s a 0,2% de aceite de “manuka”, “árbol de té” y “eucalipto”. Concluyeron que todos los aceites esenciales, incluyendo el de “eucalipto”, inhibieron a *S. mutans*.⁽³³⁾

Romero *et al.* en el año 2009, en Venezuela, realizaron el estudio “Actividad inhibitoria de la *Matricaria recutita* "manzanilla alemana" sobre el *Streptococcus mutans*” el cual tuvo como objetivo determinar la actividad bacteriostática del aceite de “manzanilla” en cepas n.º 656, 659 y 660 de *S. mutans*. Usaron 10 µL en

concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125% y 0,390625%. Obtuvieron como resultados que a las 24 horas hubo capacidad bactericida en todas las concentraciones, a las 48 horas sólo al 100%; los halos de inhibición fueron de 11 mm, 8 mm y 12 mm al 100%, y 8 mm, 5 mm y 9 mm al 50% en las cepas n.º 656, 659 y 660. Concluyeron que hay efecto bacteriostático del aceite de “manzanilla” al 100% y 50% sobre cepas de *S. mutans*.⁽³⁹⁾

2.7.2. A nivel nacional:

Rojas *et al.* en el año 2010, en Lima, realizaron el estudio “Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales” el cual tuvo como objetivo determinar la actividad citotóxica de los aceites en células de mamíferos. Obtuvieron los aceites esenciales de “menta”, “romero”, “paico”, “eucalipto”, “ajenjo”, “toronjil”, “muña”, “cedrón” y “hierba luisa” por arrastre de vapor de agua. Obtuvieron como resultados que todos los aceites esenciales tenían falta de toxicidad para las células mamíferas cuando CI50 fue menor a 100 µg/mL. Concluyeron que todos los aceites esenciales, incluido el de “eucalipto”, no mostraron toxicidad para las células mamíferas *in vitro*.⁽³⁷⁾

Vela en el año 2017, en Trujillo, realizó el estudio “Estudio comparativo *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de ‘eucalipto’ con gluconato de clorhexidina sobre el *Streptococcus mutans*” el cual tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del “eucalipto” sobre *S. mutans* ATCC 25175. Usó el método de difusión en discos, con concentraciones de 50%, 75%, 100%, y 10 repeticiones. Obtuvo como resultados que los halos de inhibición en promedio fueron de 16,7 mm para 50%, 19,1 mm para el 100%, y 20,3 mm para

el control positivo. Concluyó que existe efecto antibacteriano del “eucalipto” sobre *S. mutans*; y que, a mayor concentración, mayor efecto inhibitorio.⁽²⁷⁾

Cahuana y Condori en el año 2017, en Puno, realizaron el estudio “Efectividad inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*” el cual tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio del extracto de “eucalipto” sobre *S. mutans* y *Candida albicans*. Usaron concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, y colocaron 10 µL de extractos en los discos. Obtuvieron como resultados que los halos de inhibición fueron de 11,85 mm para el 25%; 13,13 mm para 50%; 14 mm para 75%; y 15,54 mm para 100%. Concluyeron que el extracto etanólico de “eucalipto” presentó efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans*.⁽²⁸⁾

Eduardo *et al.* en el año 2018, en Piura, realizaron el estudio “Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Ruta graveolens* (ruda), *Plantago major* (llantén) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668” el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano de los extractos hidroetanólicos de “algarrobo”, “ruda” y “llantén” sobre el *S. mutans*. Usaron concentraciones a 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL. Obtuvieron como resultados que el extracto de “algarrobo” tuvo halos de inhibición mayores que el control positivo, el de “ruda” a 600 µg/mL un halo igual al control positivo y el de “llantén” a 900 µg/mL un halo de 18 mm y a 1000 µg/mL un halo de 22 mm. Concluyeron que las 3 plantas tienen efecto antibacteriano.⁽¹⁹⁾

Alvarado y Maromi en el año 2010, en Lima, realizaron el estudio “Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major*, *Erythroxylum*

novogranatense var truxillense y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica” el cual tuvo por objetivo comparar la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de “llantén”, “coca trujillo” y “té verde” sobre cepas de *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. viscosus*, *P. melaninogenicus* y *F. nucleatum*. Usaron concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL. Obtuvieron como resultados que los 3 extractos mostraron diferencias significativas frente al control positivo, de halo 22 mm. Concluyeron que los tres extractos hidroalcohólicos poseen efecto antibacteriano en ambas concentraciones sobre las cepas estudiadas.⁽²⁴⁾

Rivera en el año 2015, en Arequipa, realizó el estudio “Efecto de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos a base de “llantén” (*Plantago mayor*) y “té verde” (*Camellia sinensis*), a la concentración del 25%, 50% y 100% sobre *Streptococcus mutans*” el cual tuvo como objetivo evaluar y comparar la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos “llantén” y “té verde” sobre *S. mutans*. Usó el método de difusión con discos en agar mitis salivarius. Obtuvo como resultado que ambos extractos poseen mayor efecto al 100%, mientras que al 50% y al 25% no tienen diferencias estadísticamente significativas. Concluyó que los extractos hidroalcohólicos de “llantén” y “té verde” poseen propiedades antibacterianas sobre al *S. mutans*.⁽²²⁾

Alvarado y Vásquez en el año 2014, en Lambayeque, realizaron el estudio “Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. 'eucalipto' a diferentes concentraciones en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis” el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de “eucalipto” sobre *S. aureus*. Usaron concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL. Obtuvieron como resultado que el extracto de

"eucalipto" a 500 mg/mL tuvo mayor efecto inhibitorio con un halo de inhibición de 19,29 mm. Concluyeron que el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de "eucalipto" es directamente proporcional a su concentración.⁽³⁰⁾

Landeo en el año 2018, en Lima, realizó el estudio "Actividad inhibitoria de los aceites esenciales comerciales de *Mentha spicata* y *Eucalyptus globulus* sobre biopelículas de *Streptococcus mutans* en un modelo *in vitro*" el cual tuvo como objetivo evaluar la actividad inhibitoria de los aceites de "hierba buena" y "eucalipto" de origen comercial sobre *S. mutans* ATCC 25175. Los aceites esenciales fueron aplicados a una concentración de 0,5%. Obtuvo como resultado que los halos de inhibición fueron de $18,3 \pm 0,47$ mm y $27,0 \pm 0,82$ mm, para "hierba buena" y "eucalipto" respectivamente. Concluyó que ambos aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente al *S. mutans*.⁽³¹⁾

Juscamaita en el año 2015, en Lima, realizó el estudio "Efecto inhibidor del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% y el enjuague bucal Colgate Plax® sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, estudio *in vitro*" el cual tuvo por objetivo determinar el efecto inhibidor del aceite esencial del "eucalipto" contra clorhexidina al 0,12% y enjuague bucal Colgate Plax® en la inhibición de *S. mutans*. Usó concentraciones al 25%, 50% y 100% del aceite de "eucalipto". Obtuvo como resultados que el "eucalipto" presentó halos de inhibición de 6,88 mm, 9,61 mm y 12,65 mm a las 24 horas. Concluyó que el aceite esencial de "eucalipto" posee mejores propiedades antibacterianas al 100%.⁽³²⁾

Andonayre en el año 2019, en Trujillo, realizó el estudio “Efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” sobre *Streptococcus mutans* comparado con Azitromicina, estudio *in vitro*” el cual tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial “manzanilla” sobre *S. mutans* ATCC 35668. Usó 10 µL en concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100%, como control positivo Azitromicina 5ug, y control negativo solución salina al 0,9%. Obtuvo como resultado que los halos de inhibición a partir del 75% estaban entre 20,6 mm a 24,5 mm, similares a los halos inhibitorios del control positivo. Concluyó que el aceite esencial de “manzanilla” mostró efecto antibacteriano a partir de concentraciones del 75% sobre *S. mutans*.⁽³⁸⁾

Cosco en el año 2010, en Lima, realizó el estudio “Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* (manzanilla)” el cual tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio de la “manzanilla” en flora mixta salival, cepa aislada *mutans* y cepa patrón ATCC 25175. Usó concentraciones al 25%, 50% y 100% de “manzanilla”. Obtuvo como resultados que los halos de inhibición del aceite esencial de “manzanilla” en la flora mixta salival fueron de 9 mm y en la cepa patrón de 22 mm, para la concentración al 100%; siendo similar al control positivo. Concluyó que existe efecto inhibitorio del aceite de “manzanilla” en cultivos de flora mixta salival, en la cepa aislada *mutans*, y en la cepa patrón.⁽⁴²⁾

Meléndez en el año 2017, en Trujillo, realizó el estudio “Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* “eucalipto” sobre *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*” el cual tuvo por objetivo evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de “eucalipto” sobre *S. pyogenes* y *P.*

aeruginosa. Usó concentraciones al 50%, 75% y 100% e hizo 10 repeticiones por cada una. Obtuvo como resultado que el aceite esencial de “eucalipto” no mostró diferencias significativas en sus concentraciones. Concluyó que el “eucalipto” tiene propiedades antibacterianas *in vitro* sobre *S. pyogenes* y *P. aeruginosa*.⁽²⁹⁾

Acuña en el año 2014, en Lima, realizó el estudio “Crecimiento de *Streptococcus mutans* frente al colutorio experimental a base de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) a diferentes concentraciones comparado con el colutorio experimental de clorhexidina al 0,12%” el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano del colutorio a base de “manzanilla” sobre *S. mutans* comparándolo con clorhexidina al 0,12%. Usó concentraciones de “manzanilla” al 50%, 25%, 12,5%, 6,25% y 3,125%. Obtuvo como resultados que el colutorio de “manzanilla” en las concentraciones de 50% y 25%, no muestra diferencias significativas con el grupo control. Concluyó que el colutorio de “manzanilla” posee propiedades antimicrobianas sobre *S. mutans*.⁽⁴¹⁾

Jáuregui en el año 2013, en Trujillo, realizó el estudio “Efecto antibacteriano *in vitro* del colutorio a base de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) a diferentes concentraciones sobre la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus mutans*” el cual tuvo como objetivo determinar la efectividad de un colutorio a base de “manzanilla” sobre *S. mutans*. Usó concentraciones de 0,10%, 0,25% y 0,50%, como control positivo usó aceite esencial puro. Obtuvo como resultado que a concentración de 0,10% hubo un crecimiento de 5,727 UFC/mL, a 0,25% de 5,545 UFC/mL, a 0,50% de 4,818 UFC/mL, sin diferencias significativas entre estos. Concluyó que la “manzanilla” posee un efecto antibacteriano *in vitro* sobre *S. mutans*.⁽⁴⁰⁾

Choque en el año 2017, en Puno, realizó el estudio “Efectividad del enjuague bucal de *Matricaria chamomilla* frente al de *Plantago major*, en el control de la placa bacteriana en adolescentes de 15 a 16 años en la I.E.S. Juan Bustamante de Lampa” el cual tuvo como objetivo determinar la efectividad del enjuague bucal de “manzanilla” frente al de “llantén” en el control de la placa bacteriana en adolescentes de 15 a 16 años. Realizó el OHI-S previamente, usaron los colutorios 30 segundos dos veces al día por 14 días. Obtuvo como resultado que el IHOS en los grupos experimentales a los 7 días mejoró a regular y a los 14 días a bueno. Concluyó que la efectividad del enjuague bucal de “manzanilla” fue superior al de “llantén” en el control de la placa bacteriana.⁽²⁰⁾

A partir de lo que acaba de exponerse, se tiene que:

La *Matricaria chamomilla* conocida comúnmente como “manzanilla”, es una hierba aromática de bajo crecimiento con tallos ramificados, hojas dobles y plumosas, y flores de cabeza pequeña y suaves.⁽⁶²⁾

Es nativa de Europa, tiene unos 60 cm de altura, y se adapta a diferentes suelos y climas, aunque su calidad aumenta en climas templados cálidos con una temperatura entre 15 °C a 23 °C, en condiciones subhúmedas.⁽⁵³⁾

Se han identificado más de 120 componentes en sus flores, en especial son ricas en flavonoides; quienes le dan propiedades antiinflamatorias, espasmolíticas, antipépticas, sedantes, antibacterianas y antifúngicas, haciéndola comercial en el ámbito medicinal.⁽⁵⁴⁾

El *Plantago major* conocido comúnmente como “llantén”, es una planta medicinal perenne que pertenece al género *Plantago* y la familia de las *Plantaginaceae*. Su

nombre se origina del latín "planta", que significa 'suela del pie', referencia al tamaño de sus hojas.⁽⁵⁷⁾ Su altura varía entre 15 a 30 cm, y su ciclo de vida va de 6 a 7 meses, su floración se produce entre los meses de mayo y octubre.⁽⁶³⁾

Se considera originaria de Europa. Suele crecer en los bordes de las carreteras, en praderas y campos cultivados, donde hay canales de agua.⁽⁶⁴⁾ Crece en climas templados y fríos, no se cultiva por lo que lo consideran una mala hierba.⁽⁶³⁾

Dentro de sus propiedades, tenemos que la aucubigemina, tiene mayor relevancia y es responsable de su capacidad antibacteriana. Otros compuestos como acteosida y plantamajosida le confieren también propiedades antibacterianas.⁽⁵⁸⁾

Tiene varios ingredientes activos, como mucílago, baicaleína, flavonoides, alantoína, pectina, taninos, aucubina, acteroside, ácido salicílico y sales minerales de potasio y zinc; quienes le dan sus propiedades sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, astringentes, antihemorrágicas y cicatrizantes; por lo que en el campo de la salud humana existen medicamentos a base de sus compuestos.⁽⁶³⁾

La introducción del "eucalipto" como planta medicinal es reciente, comienza a usarse desde el siglo XVIII.⁽²⁷⁾ Es un árbol de gran tamaño originario de Australia y Tasmania, por lo que se considera "exótico" perteneciente a la familia mirtácea. Sus hojas contienen entre 3% a 5% de aceite esencial, con olor balsámico, siendo un poderoso desinfectante natural. Su principal componente es el eucaliptol que está en un 75% a 85% en el aceite esencial, es el que le da propiedades bacteriostáticas, bactericidas y fungicidas. Además, posee terpenos y alcoholes como el pineno, canfeno, terpinol y eugenol; además acetonas y aldehídos.⁽²⁷⁾

2.8. Definición de términos básicos

2.8.1. Halo de inhibición:

Zona que rodea al disco donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento una bacteria en un tiempo determinado, que va casi siempre de 18 a 24 horas, desde la incubación de esta. Se usará los milímetros para medir esta zona, según la escala de Duraffourd.⁽²⁷⁾

2.8.2. Escala de Duraffourd:

Usada para medir cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro*, en halos de inhibición.⁽²⁷⁾

Sensibilidad nula (-): diámetro < 8 mm

Sensible (+): diámetro ≥ 8 mm y ≤ 14 mm

Muy sensible (++) : diámetro > 14 mm y ≤ 20 mm

Sumamente sensible (+++) : diámetro > 20 mm

2.8.3. Extracto hidroalcohólico:

Se obtiene de la maceración de un vegetal, al ponerse en contacto con etanol o agua como solventes.⁽⁶⁵⁾ Por lo cual el extracto se va a obtener bajo el procedimiento de reblandecimiento, el cual es realizado a temperatura ambiente. Se trata de remojar la planta en un solvente hasta que este se introduzca disolviendo las porciones solubles, luego se coloca en un depósito para que repose, y se aplica el método por agitación. Luego se filtra el líquido para obtener el extracto.⁽⁶⁶⁾

CAPÍTULO III. MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación

La presente investigación es básica, explicativa, tiene un enfoque cuantitativo y es cuasi experimental, a la vez es transversal y prospectiva.

3.2 Unidad de análisis, universo y muestra

3.2.1. Universo

Conformado por las cepas *Streptococcus mutans*.

3.2.2. Población

Conformado por la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

3.2.2.1. Criterios de selección

a. Criterios de inclusión:

Cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en placas de Petri en buen estado.

b. Criterios de exclusión

Cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en placas de Petri que sufran algún daño durante la investigación.

3.2.3. Unidad de análisis

Cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en placas de Petri con agar Mueller Hinton.

3.2.4. Unidad de muestreo

Cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), que cumpla con los criterios de inclusión y exclusión, concentraciones usadas de cada extracto puro y en combinación, y los grupos control.

3.2.5. Unidad de observación

Cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en cada una de las placas de Petri con agar Mueller Hinton

3.2.6. Tamaño muestral

La muestra fue no probabilística por conveniencia. Se tomó en cuenta el método estandarizado de CLSI, el cual establece 7 repeticiones como mínimo para la elaboración de este tipo de estudio, de lo cual se partió y se optó por realizar 10 repeticiones por cada grupo.

3.3. Métodos de investigación

Método científico desde la perspectiva del método hipotético deductivo, usa principios generales para plantear una hipótesis y llegar así a una conclusión específica.

3.4. Técnica de investigación

Cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) según colonias mediante la observación.

3.5. Instrumentos

Hoja de registro donde se anotaron las medidas de los halos de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Matricaria chamomilla*, *Plantago*

major, *Eucalyptus globulus* a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 12,5%; y de sus combinaciones en las mismas concentraciones; de la clorhexidina al 0,12%, y alcohol al 96°.

3.6. Técnicas de análisis de datos

Los resultados de este estudio fueron procesados y tabulados en el programa Microsoft Excel, para elaborar la base de datos en el programa IBM SPSS versión 26 para Windows.

Dado que los datos presentaron una distribución normal, se usaron pruebas paramétricas para el análisis, en donde se usaron los parámetros de desviación estándar y la media aritmética.

Así mismo se usó la prueba de análisis de varianza para las comparaciones de grupos múltiples, y la prueba post hoc de Tukey para las comparaciones de grupo, y se consideró a $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Los resultados finalmente se presentarán en tablas de frecuencia y en gráficos, en base a los objetivos planteados para su posterior análisis.

3.7. Aspectos éticos de la investigación

La presente investigación se realizó mediante el uso de especies vegetales de *Matricaria chamomilla*, *Plantago major* y *Eucalyptus globulus*; teniendo en cuenta el cuidado de la biodiversidad de la zona de donde fueron recolectadas. También se usó la cepa estandarizada de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), obtenida del laboratorio GenLab - Lima, Perú. No se involucró a seres humanos o animales, razón por la cual no se requirió de consideraciones que protejan sus derechos.

3.8. Proceso

3.8.1. Sitio de investigación

La parte experimental de esta investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas (InvBiomed S.R.L.) (Anexo 1)

3.8.2. Obtención y preparación de las plantas

- La recolección de la muestra se realizó en la provincia y departamento de Cajamarca en:

- Distrito de Jesús, ubicado a 2531 m s. n. m., a una latitud sur 7°14' 44", y oeste 78°22'40"; aquí se recolectó la planta *Plantago major*.
- Centro poblado Otuzco, ubicado a 2742 m s. n. m., a una latitud sur 7°07'25, y oeste 78°27'24; aquí se recolectó la planta *E. globulus*.
- Distrito de Namora, ubicado a 2743 m s. n. m., a una latitud sur 7°12'6", oeste 78°19'29"; aquí se recolectó la planta *M. chamomilla*.

- Se recolectó 2 kg de las plantas *Plantago major*, *Eucalyptus globulus* y *Matricaria chamomilla*, libres de hongos. Figura 2

- En el laboratorio, se seleccionó más a detalle las muestras vegetales; descartando de las plantas recolectadas, las vainas en mal estado, enfermas y/o con hongos.

- Se lavó cada planta con agua destilada y se las dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas.

- Se procedió a separar las raíces de cada planta, dejando las partes principales.

- Posteriormente se colocaron 500 g de cada planta (peso húmedo) a secar en la estufa a 56 °C por 72 horas, sobre papel Kraft. Figura 3
- Una vez que se obtuvo la muestra seca, se determinó su peso en seco, donde “manzanilla” tuvo 94,6 g, “llantén” 86,7 g, y “eucalipto” 105,2 g
- Luego se continuó con la pulverización de cada planta con un mortero.
- Se pasó por un tamiz n.º 40 para obtener un polvo más fino. Figura 4
- Se guardó el polvo de cada planta en frascos de vidrio de color ámbar debidamente rotulados, para su posterior uso.

3.8.3. Obtención del extracto hidroalcohólico de cada plata:

- Se pesó 50 g de polvo de cada planta, y se añadió 300 mL de alcohol de 70° en un matraz forrado de papel aluminio para evitar la entrada de luz.⁽⁶⁷⁾
- Se usó el método de agitación constante, donde cada matraz se colocó en una plancha con agitación, graduada a 300 revoluciones / minuto por 24 horas.⁽⁶⁷⁾ Figura 5
- Una vez obtenido el extracto de cada planta, se procedió al filtrado 4 veces: primero con algodón, segundo con papel filtro Whatman n.º 41, tercero filtrado con papel filtro Whatman n.º 2, y el cuarto filtrado con papel Whatman n.º 1. Figura 6
- Se obtuvo extractos purificados libres de gérmenes de cada planta, se procedió a colocarlos en frascos color ámbar previamente esterilizados y rotulados, los cuales fueron refrigerados hasta su posterior uso.

3.8.4. Procedimiento para determinación de la actividad antibacteriana in vitro: (Anexo 2)

a. Preparación del medio de cultivo Agar Sangre enriquecida con sangre de cordero.

- Se pesó en 34,2 g de agar Mueller – Hinton en una balanza analítica y se colocó en un frasco de dilución de vidrio de tapa rosca de 1000 mL,
- Se agregó 900 mL de agua destilada, y se procedió a calentar hasta obtener una mezcla homogénea.
- Se esterilizó a 121 °C con 15 libras de presión atmosférica por 15 minutos.
- Se dejó enfriar entre 45 °C a 50 °C.
- Se agregó 45 mL de sangre de cordero previamente desfibrinada, en un ambiente estéril.
- Se colocó 30 mL del medio en placas de Petri de 90 mm de diámetro interno, de modo que el grosor del agar fue de 4 mm aproximadamente.
- Se dejó enfriar 30 minutos.
- Se realizó el control de calidad por 24 horas, llevando las placas de Petri a una estufa a 36 °C ± 1 °C.

b. Preparación del caldo Mueller–Hinton

- Se pesó 4,2 g de agar Mueller–Hinton, marca Merck KGaA – Alemania, se depositó en un frasco de vidrio de 500 mL, luego se agregó 200 mL de agua destilada. Se procedió a tapan el frasco con tapa rosca y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. Figura 7

- Se procedió a esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión atmosférica, por 15 minutos.
- Se llevó a refrigeración hasta su posterior uso.

c. Cepa bacteriana para el estudio

- Se trabajó con una cepa bacteriana estándar de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) obtenida del laboratorio GenLab-Lima, Perú. (Anexo 3)

d. Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

(Anexo 4)

- Se sacó el empaque de la caja que contiene el microorganismo.
- Se dejó la bolsa que contiene la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en una mesa por 20 minutos, sin abrir, para que se adapte a la temperatura ambiente. Figura 8
- Se abrió la bolsa por la muesca.
- Se apretó la parte superior de la pipeta, para liberar el líquido que hidrata a la cepa.
- Se sujetó en posición vertical y se golpeó sobre una superficie dura para ayudar a que el líquido fluya a través del eje del hisopo, hacia la parte interior que contiene el sedimento.
- Se presionó la parte inferior y se trituró el sedimento en el líquido hasta su homogenización.
- Se incubó 36 °C ± 1 °C por 15 minutos. Figura 9
- Se sembró con la técnica de agotamiento en las placas de Petri que contenían sangre de carnero desfibrinada (5%), se rotuló con el nombre de la cepa, fecha y hora de la siembra. Figura 10

- Se incubó en condiciones de microaerofilia a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; por 24 horas.

Figura 11

3.8.5. Susceptibilidad *in vitro* a antibacterianos:

a. Método: test de disco difusión en agar

Se usó el antibiograma basado en Kirby Bauer para la determinación de la sensibilidad bacteriana, método recomendado por el CLSI (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria).⁽⁶⁸⁾(Anexo 5)

b. Estandarización del inóculo

Se tomó de 3 a 5 colonias de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) del cultivo y se suspendió en 4 mL de caldo Mueller-Hinton. Se incubó por 3 horas, y se obtuvo una turbidez de 0,5 según la escala de McFarland.⁽⁶⁸⁾

Figura 14

c. Diseño experimental: (10 repeticiones)

i. Grupo experimental:

- Grupo Problema 0: Diluciones individuales de extracto hidroalcohólico de “manzanilla”, “llantén” y “eucalipto” (100%, 50%, 25% y 12,5%).
- Grupo Problema 1: Las diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico de “manzanilla”+“llantén” (100%, 50%, 25% y 12,5%).
- Grupo Problema 2: Las diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico de “llantén” + “eucalipto” (100%, 50%, 25% y 12,5%).
- Grupo Problema 3: Las diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico de “manzanilla”+“eucalipto”(100%,50%,25%y 12,5%)
- Grupo Control Positivo: Gluconato de clorhexidina al 0,12%.
- Grupo Control Negativo: Alcohol etílico al 96° (diluyente).

Para la preparación de las diluciones, se midió 4 mL de cada extracto al 100% con una micropipeta, y se fue haciendo las diluciones de mayor a menor, tomando 2 mL de la concentración anterior con 2 mL del diluyente, que en este caso fue alcohol 96°, hasta llegar a la concentración mínima deseada.⁽⁶⁸⁾

Para la preparación de las diluciones en sinergia, se usaron 2 mL de cada extracto a combinar en este caso desde el 100% y se agitó con la micropipeta para lograr una distribución uniforme de ambos extractos, luego se extrajo 2 mL de cada dilución en sinergia y se agregó a los tubos restantes, con 2 mL del diluyente, hasta la mínima concentración deseada.⁽⁶⁸⁾ Figura 15

Una vez obtenidas todas las concentraciones, se procedió a su refrigeración hasta su posterior uso.⁽⁶⁸⁾

ii. Control Microbiológico:

- Control de Esterilidad: Placa de Petri con medio de cultivo.
- Control de crecimiento bacteriano: Placa de Petri con siembra de la cepa patrón.⁽⁶⁸⁾

iii. Impregnación de los discos:

- Se agregará 50 µL de cada concentración, en discos de susceptibilidad antimicrobiana Thermo Scientific™ Oxoid™ de 6 mm de diámetro, con la ayuda de una micropipeta (marca Boeco), hasta su completa absorción.⁽⁶⁸⁾ Figura 16

iv. Evaluación de la actividad antibacteriana - Difusión en agar

- Después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) se tuvo 15 minutos para inocular

la superficie de las placas de Petri con agar sangre, por rayado con el hisopo, previamente rotuladas. Se realizó en toda la superficie en tres direcciones diferentes, rotando la placa 60° cada vez para una distribución uniforme, luego también se pasó sobre los bordes de la placa con agar.⁽⁶⁸⁾ Figura 17

- Se realizó 10 veces este procedimiento por cada concentración.⁽⁶⁸⁾

v. Aplicación de los discos en placas inoculadas

- Se colocó los discos previamente impregnados: 04 discos con 4 concentraciones diferentes (12,5%, 25%, 50% y 100%) del extracto hidroalcohólico n.º 1, 2 y 3, la combinación de extractos 1 y 2, 2 y 3, y 1 y 3; un disco con gluconato de clorhexidina 0,12% (control positivo) y otro con alcohol etílico 96° (control negativo), distribuidos a una distancia mayor a 24 mm (según CLSI). Se presionó ligeramente cada disco, para asegurar el contacto con el agar.⁽⁶⁸⁾ Figura 18
- Control Microbiológico: se incluyó una placa de control de esterilidad y control de crecimiento bacteriano.
- Las placas se colocaron invertidas en ambiente de microaerofilia (en jarra con vela encendida) e incubadas (incubadoras Memmert) a 36 °C ± 1 °C durante 24 horas.⁽⁶⁸⁾ Figura 19

vi. Lectura e Interpretación:

- Luego de las 24 horas de incubación (según CLSI) se procedió a la medición de los halos de inhibición correspondiente a cada disco de papel de filtro de las concentraciones usadas, pasando por el centro del disco, con la ayuda del calibrador pie de rey.⁽⁶⁸⁾ Figura 20

- Sólo se consideró la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de hemólisis.⁽⁶⁸⁾ Los datos fueron registrados en el formato correspondiente. (Anexo 6) Figura 21
- Se determinó el diámetro de inhibición obtenido a través de Escala de Duraffourd⁽⁶⁸⁾:
 - ✓ Sensibilidad nula (-): diámetro < 8 mm
 - ✓ Sensible (+): diámetro ≥ 8 mm y ≤ 14 mm
 - ✓ Muy sensible (++) : diámetro > 14 mm y ≤ 20 mm
 - ✓ Sumamente sensible (+++) : diámetro > 20 mm
- Las medidas de los halos de inhibición fueron comparadas con los halos de los grupos control para poder comparar su resistencia o susceptibilidad.⁽⁶⁸⁾

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados:

Para determinar el efecto sinérgico *in vitro* de las combinaciones de los extractos de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); a diferentes concentraciones, en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), se realizaron 10 repeticiones por grupo, luego se hizo la lectura de los halos de inhibición de dichas combinaciones en las placas de Petri con la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) con agar Mueller Hinton.

Se determinó que existe efecto sinérgico inhibitorio en la combinación de extractos de *Plantago major* + *Eucalyptus globulus* al 100%, con un halo inhibitorio promedio de 8,4 mm siendo sensible según la escala de Duraffourd; así mismo no se encontró efecto sinérgico inhibitorio según esta escala en las otras combinaciones a ninguna de las concentraciones usadas. Por otro lado, la combinación de *Plantago major* + *Eucalyptus globulus* al 50% mostró un halo de inhibición promedio de 7,6 mm con sensibilidad nula según la escala de Duraffourd; tanto la concentración al 50% como la concentración al 100% de la combinación de extractos de *Plantago major* + *Eucalyptus globulus*, mostraron diferencias significativas ($p < 0,5$) con los demás grupos según el análisis de varianza y la prueba Tukey. (Gráfico 1)

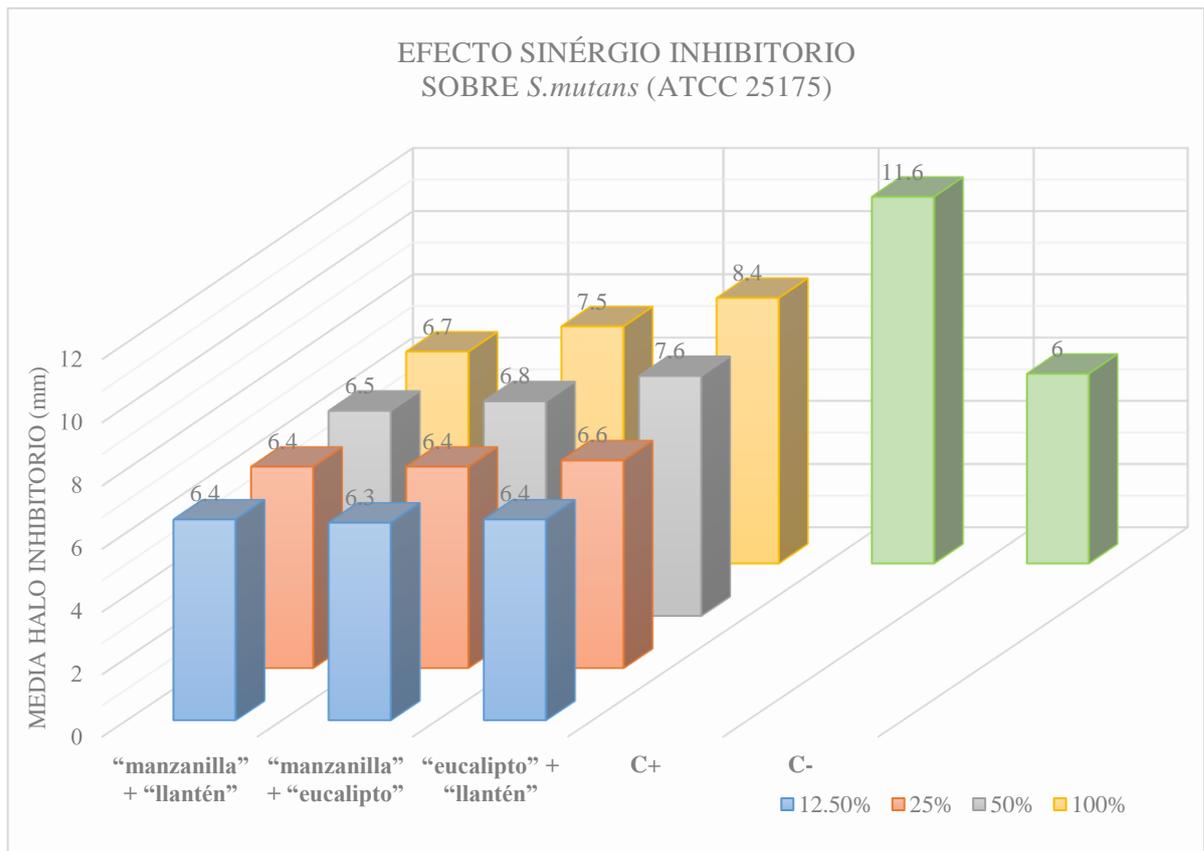


Gráfico 1 Efecto sinérgico *in vitro* en concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100%) de la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); y *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos de *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto), a diferentes concentraciones, en la inhibición del crecimiento de cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), se realizaron 10 repeticiones por grupo, luego se hizo la lectura de los halos de inhibición de estos extractos en las placas de Petri con la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) con agar Mueller Hinton.

Se determinó que el extracto puro de *Eucalyptus globulus* al 100% mostró un halo inhibitorio promedio de 8,4 mm siendo sensible según la escala de Duraffourd; por otro lado, los extractos puros de *Plantago major* y *Matricaria chamomilla* no presentaron eficacia inhibitoria sobre la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en ninguna de las concentraciones usadas, según la escala de Duraffourd. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,5$) según el análisis de varianza y la prueba Tukey, en el extracto de “eucalipto”, al 25% mostró un halo de inhibición promedio de 7,3 mm; y al 50% mostró un halo de inhibición promedio de 7,5 mm (Gráfico 2)

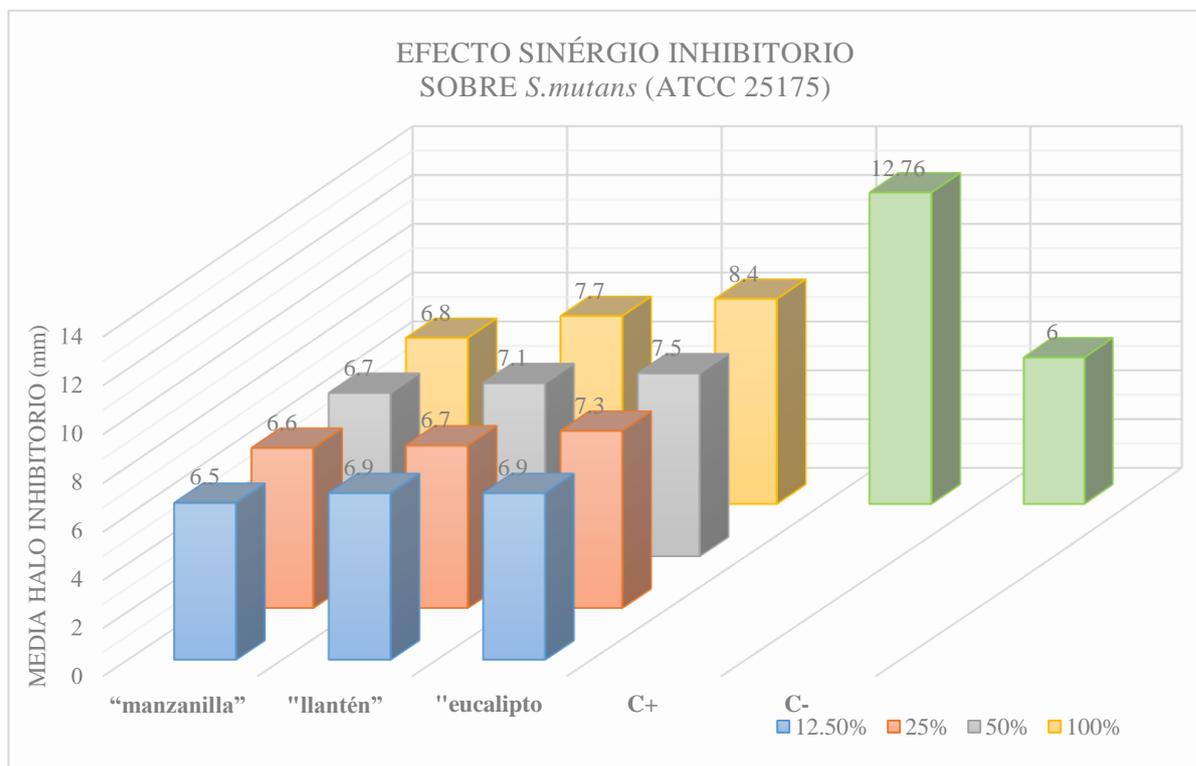


Gráfico 2 Efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* en diferentes concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100% y C+) según los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas *S. mutans* (ATCC 25175)

Discusión

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue 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) *in vitro*; para lo cual se usó el método de difusión de discos utilizando las diferentes concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100%, con 10 repeticiones por grupo.

Los resultados obtenidos demuestran que, si existe una efectividad inhibitoria en la combinación de extractos de *Eucalyptus globulus* y *Plantago major* al 100%, y en el extracto puro de *Eucalyptus globulus* al 100%, y sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) *in vitro*, donde se obtuvo según la escala de Duraffourd, que ambos grupos fueron sensibles (+).

La presente investigación es la primera en su línea, por lo que no se puede comparar los resultados obtenidos con los de otras investigaciones, ya que no existen estudios *in vitro* que demuestren la eficacia inhibitoria del efecto sinérgico de la combinación de extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) frente a la cepa *Streptococcus mutans*; pero si se lo puede comparar con investigaciones donde usaron extractos puros de las plantas mencionadas sobre otras bacterias de la cavidad oral.

A partir de los resultados obtenidos se encontró que estos guardan relación con Gontijo⁽²⁵⁾, quien demostró en su estudio que la efectividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de especies vegetales presenta mayor actividad sobre

bacterias Gram-positivas, como la cepa *Streptococcus mutans* usada en la presente investigación.

Así mismo, los resultados obtenidos concuerdan con los resultados encontrados por Cahuana y Condori⁽²⁸⁾, quienes demostraron que los extractos etanólicos de *Eucalyptus globulus* sobre cepas de *Streptococcus mutans* mostraban efectividad inhibitoria a las concentraciones al 50% y al 100%, siendo sensibles (+) según la escala de Duraffourd.

Los resultados guardan una relación también con los obtenidos por Yáñez y Cuadro⁽⁶⁹⁾, quienes concluyeron que el aceite de *Eucalyptus globulus* mostraba efecto inhibitorio tanto sobre bacterias gran-positivas como en bacterias gram-negativas, encontraron que el aceite de *Eucalyptus globulus* al 100% mostró halos de inhibición de 10 mm, mientras que al 60% mostró halos de inhibición de 7,2 mm en promedio, representando sensibilidad nula según la escala de Duraffourd; lo mismo ocurrió con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde *Eucalyptus globulus* a la concentración de 50% presentó halos de inhibición en promedio de 7,5 mm con sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

Los resultados obtenidos concuerdan con los resultados de Alvarado⁽²⁴⁾, quien encontró que los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Plantago major* tuvieron un promedio de 7,6 mm presentando una sensibilidad nula en la escala de Duraffourd; así como los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se obtuvo un halo de inhibición promedio de 6,8 mm del extracto hidroalcohólico de *Plantago major*, representando también una sensibilidad nula según la escala de Duraffourd sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Los resultados obtenidos también guardan relación con los obtenidos por Rivera⁽²²⁾, quién concluyó que el extracto hidroalcohólico de *Plantago major* a las concentraciones de 25% y 50%, sobre cepas de *Streptococcus mutans*, mostraron una sensibilidad nula según la escala de Duraffourd, así como los resultados obtenidos en la presente investigación. Pesantes *et al.*⁽⁶³⁾ encontró que los halos de inhibición promedio del extracto etanólico de *Plantago major* al 100% fueron de 6,2 mm sobre cepas *P. gingivalis*; siendo inferiores a los resultados encontrados en esta investigación, donde los halos a la concentración del 100% fueron de 6,8 mm; sin embargo, ambos estudios coinciden en que el extracto de *Plantago major* presentó sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

Se coincide también con los resultados obtenidos por Teles⁽⁷⁰⁾, quién concluyó que el extracto acuoso de *Plantago major* no presentó actividad antimicrobiana sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas en las concentraciones de 50% y 100%. Los resultados obtenidos coinciden también con los resultados de Valverde⁽⁷¹⁾, quién demostró que el extracto de *Plantago major* no posee poder inhibitorio a las diferentes concentraciones de 100%, 50% y 25% frente a cepas de *Streptococcus mutans*, representando sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

Así mismo Fiestas y Huanca⁽⁷²⁾ tampoco encontraron efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Plantago major* a las concentraciones de 100%, 75% y 50% sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*, coincidiendo con los resultados obtenidos en la presente investigación. Del mismo modo se coincide con los resultados obtenidos por Vásquez⁽⁷³⁾, quien demostró que el extracto metanólico de *Plantago major* no presentó la eficacia inhibitoria deseada en *Staphylococcus aureus*, mostrando una sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

Los resultados obtenidos coinciden con los resultados encontrados por Silva *et al.*⁽⁷⁴⁾, quienes encontraron que los extractos naturales de *Matricaria chamomilla* poseen baja actividad antimicrobiana frente a cepas de *Streptococcus mutans*, siendo similares a los resultados obtenidos en esta investigación, donde se demostró que no hay diferencia significativa entre las combinaciones usadas de *Matricaria chamomilla* frente a las cepas de *Streptococcus mutans*, y que los halos de inhibición presentaban sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

De la misma manera, los resultados obtenidos coinciden con los resultados de Talavera⁽⁵⁶⁾, quien concluyó que no existe efecto antibacteriano *in vitro* de las infusiones de *Matricaria chamomilla* sobre las cepas de *Streptococcus mutans*, en ninguna de las concentraciones que usó, que fueron al 2%, 4%, 6% y 8%; coincidiendo en que los halos inhibitorios tuvieron sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

Los resultados de la presente investigación difieren con los encontrados por Romero⁽³⁹⁾, quien demostró que el aceite esencial de *Matricaria chamomilla* sobre la cepa *S. mutans* a la concentración del 100% mostró un halo de inhibición promedio de 8 mm, siendo sensible según la escala de Duraffourd; mientras que nuestros resultados indican que a esta concentración se obtuvo un halo promedio de 7,7 mm, mostrando una sensibilidad nula según la escala de Duraffourd; sin embargo los resultados de esta investigación indicaron que a la concentración de 50% el halo de inhibición en promedio es de 7,1 mm, siendo mayores a los resultados de Romero, quién encontró que al 50% el halo inhibitorio en promedio fue de 6 mm.

Por otro lado, Sharma *et al.*⁽⁷⁵⁾ encontró que los halos de inhibición del extracto de *Eucalyptus globulus* a las concentraciones de 50% y 100% fueron de 6,1 mm, mostrando una sensibilidad nula según la escala de Duraffourd; siendo estos inferiores a los encontrados en la presente investigación, donde los halos de inhibición al 50% fueron de 7,5 mm en promedio, y al 100% fueron de 8,4 mm en promedio, siendo al 100% sensibles según la escala de Duraffourd.

Así mismo, los resultados obtenidos en la presente investigación difieren con los resultados encontrados por la investigación de Borja⁽²¹⁾, la cuál es la única que evalúa la eficacia inhibitoria en sinergia de los extractos de *Matricaria chamomilla* y *Eucalyptus globulus* sobre cepas *Porphyromonas gingivalis*, quién encontró que en los extractos en combinación presentaban un halo de inhibición de 16,47 mm en promedio, siendo muy sensibles según la escala de Duraffourd; siendo superiores a los resultados encontrados en esta investigación donde los halos inhibitorios en promedio fueron de 6,5 mm para esta combinación, mostrando sensibilidad nula según la escala de Duraffourd.

Esto puede deberse a diferentes motivos, principalmente a la cepa escogida, ya que la cepa de *P. gingivalis* utilizada en el estudio de Borja es una bacteria Gram-negativa a diferencia de la cepa *Streptococcus mutans*, escogida en esta investigación; puede deberse al lugar de procedencia de las plantas, siendo el estudio de Borja en Ecuador; también puede deberse a la época de recolección de las plantas.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

- Se determinó mediante la presente investigación que existe un efecto sinérgico en la combinación de los extractos de *Eucalyptus globulus* y *Plantago major* en la inhibición de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) *in vitro* en la concentración de 100%.
- Se determinó que existe un efecto inhibitorio sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) *in vitro* en la concentración de 100% de *Eucalyptus globulus*.
- Se determinó que el halo inhibitorio al comparar la combinación de los extractos de *Eucalyptus globulus* y *Plantago major* al 100%, frente al extracto puro de *Eucalyptus globulus* en la concentración de 100% fue el mismo, siendo sensible según la escala de Duraffourd.
- Se determinó que no existe diferencia significativa en el efecto inhibitorio de la combinación de extractos de *Matricaria chamomilla* y *Eucalyptus globulus*; y *Matricaria chamomilla* y *Plantago major*; en las diferentes concentraciones usadas para la presente investigación.

Recomendaciones:

- Se recomienda utilizar la presente investigación como base para futuros estudios donde se aplique extractos de *Eucalyptus globulus*, *Matricaria chamomilla* y *Plantago major* sobre otras bacterias iniciadores de la enfermedad de la caries dental, y así poder demostrar su eficacia inhibitoria sobre estas.
- Estudiar el efecto sinérgico de diferentes plantas de la región, con el fin de encontrar si su combinación podría usarse como uso medicinal en el campo de la salud oral.
- Hacer estudios cromatográficos, para identificar los componentes de las plantas, así como sus principios activos, y cuáles son los que actúan sobre las bacterias.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud. Guía de práctica clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la caries dental en niños y niñas: Guía técnica. [Online]. Lima; 2017 [cited 2020 Mayo]. Available from: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4195.pdf>.
2. Ferreira A, Ritter A, Scott E. In Sturdevant C, Barton R, editors. Art and science of operative dentistry.: Elsevier Inc; 2019. p. 40.
3. Hoceini A, Klouche N, Ben-Yelles I, Mesli A, Ziouani S, Ghellai L, et al. Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults. SBMT. 2016 Agosto; 6(8).
4. Prieto J. ¿Cuándo realmente debemos intervenir de manera operatoria las lesiones de caries dental? Rev. Oactiva. 2017; 2(2): p. 35-42.
5. Jiang Q, Liu J, Chen M, Gan M, Yang D. The oral microbiome in the elderly with dental caries and health. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Enero; 8.
6. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho J, Dige I, Rud K, Jablonski A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. Caries Res. 2019 Octubre.
7. Liu G, Wu C, Abrams W, Li Y. Structural and functional characteristics of the microbiome in deep-dentin caries. J. Dent. 2020; 0(0).
8. Simón A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. Trends Microbiol. 2015 Febrero; 23(2).
9. Schwendicke F, Frencken J, Innes N, editors. In Caries Excavation: Evolution of Treating Cavitated Carious Lesions.: Karger; 2018. p. 1-10.
10. Mathur V, Dhillon J. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. Indian J. Pediatr. 2018 Marzo; 85(3).
11. Astorga B, Barraza C, Casals J, Cisterna M, Mena D, Morales F, et al. Avances en el estudio de la diversidad bacteriana oral asociada a caries dental mediante el estudio genómico. Int. J. Odontostomat. 2015; 9(3).
12. Legéňová K, Bujdáková H. Úloha Streptococcus mutans v orálnom biofilme. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2015; 64(4): p. 179-189.
13. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, et al. The Biology of Streptococcus mutans. Microbiol. Spectr. 2019 Julio; 7(1).
14. Maldonado C, Paniagua N, Bussmann R, Zenteno F, Fuentes A. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura

- a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). Ecol. Boliv. 2020 Abril; 55(1).
15. Gálvez A. Retos del Perú sobre la protección de su biodiversidad, antes y post COVID-19. SPDA Actualidad Ambiental. 2020 Mayo.
 16. Corrales I, Reyes J, Piña R. Plantas medicinales de interés estomatológico: Editorial Academia Española; 2017.
 17. Sierra M, Barros R, Gómez D, Mejía A, D. S. Productos Naturales: Metabólicos Secundarios y Aceites Esenciales. Primera ed. Barros R, Gómez D, editors. Bogotá: Entrelibros E-book solutions; 2018.
 18. Pretel O, Hilario J, Calderon A, Torres P, Mostacero J, De la Cruz A. Efecto del llantén (*Plantago major*) como antioxidante en hipotermia profunda y reperfusión experimental en conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Rev. Tayacaja. 2020; 3(1).
 19. Eduardo P, Juárez D, Morante N, Tejero P. Efecto antibacteriano "in vitro" de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Ruta graveolens* (ruda), *Plantago major* (llantén) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Tesis profesional. Piura: Universidad César Vallejo; 2018.
 20. Choque N. Efectividad del enjuague bucal de *Matricaria chamomilla* frente al de *Plantago major*, en el control de la placa bacteriana en adolescentes de 15 a 16 años en la I.E.S. Juan Bustamante de Lampa, 2017. Tesis de grado. Puno: Universidad Nacional del Antiplano; 2017.
 21. Borja V. Efecto inhibitorio del extracto de manzanilla (*Matricaria Chamomilla*), extracto de llantén (*Plantago major*) y la combinación del extracto de manzanilla y llantén comparado con la clorhexidina sobre cepa de *Porphyromona gingivalis*. Título profesional. Quito: Universidad Central de Ecuador; 2017.
 22. Rivera B. Efecto de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos hidroalcohólicos a base de llantén (*plantago mayor*) y té verde (*Camellia sinensis*), a la concentración del 25%, 50% y 100% sobre *Streptococcus mutans*. Tesis profesional. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2015.
 23. Reina E, Al-Shibani N, Allam E, Gregson K, Kowolik M, Windsor L. The effects of *Plantago major* on the activation of the neutrophil respiratory burst. J. Tradit. Complement. Med. 2013 Octubre; 3(4).
 24. Alvarado V, Moromi H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano in vitro de *Plantago major*, *Erythroxylum novogranatense* var *truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. Odontol. Sanmarquina. 2010; 13(2).

25. Gontijo C, Silva L, Correa M, Pizzolitto A, Bauab T. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2006; 42(3).
26. Martínez M. Los LLantenes: Historia y Actualidad. Tesis de grado. Tenerife :, Facultad de Farmacia; 2020.
27. Vela L. Estudio comparativo "in vitro" del efecto antibacteriano del extracto etanólico de eucalipto con gluconato de clorhexidina sobre el *Streptococcus mutans*. Tesis grado. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
28. Cahuana L, Condori T. Efectividad inhibitoria in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Tesis de grado. Puno:, Facultad de Ciencias de la Salud; 2017.
29. Meléndez J. Efecto antibacteriano "in vitro" del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* "Eucalipto" sobre *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Bachiller en medicina. Trujillo, Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
30. Alvarado J, Vásquez V. Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" a diferentes concentraciones~ en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis. Tesis de grado. Lambayeque:, Microbiología y parasitología; 2014.
31. Landeo G. Actividad inhibitoria de los aceites esenciales comerciales de *Mentha spicata* y *Eucalyptus globulus* bre biopelículas de *Streptococcus mutans* en un modelo in vitro. Tesis de grado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
32. Juscamaita E. Efecto inhibidor del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% y el enjuague bucal Colgate Plax® sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, estudio in vitro. Lima 2015. Tesis de grado. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2015.
33. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *J. Oral Microbiol.* 2004; 19(1).
34. Chandra B, Nagarajappa R, Singh R, Suma S, Thakur R. Antimicrobial efficacy of the combinations of *Acacia nilotica*, *Murrayakoenigii* (Linn.) Sprengel, *Eucalyptus*, and *Psidiumguajava* on primary plaque colonizers: An in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2016; 27(4).
35. Chaudhari L, Jawale B, Sharma S, Sharma H, Kumar C, Kulkarni P. Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Enero; 13(1).
36. Coswing J, Edmilson J, Jacob R, Fiorentini A, Padilha W. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against

- planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Ind Crops Prod.* 2014; 60: p. 304-309.
37. Rojas J, Solís H, Palacios O. Evaluación in vitro de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *An. Fac. Med.* 2010; 71(3).
 38. Andonayre Y. Efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" sobre *Streptococcus mutans* comparado con Azitromicina. Estudio in vitro. Tesis profesional. Trujillo: Universidad César Vallejo; 2019.
 39. Romero H, Hernández Y, Gil M. Actividad inhibitoria de la *Matricaria Recutita* "manzanilla alemana" sobre el *Streptococcus mutans*. *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría.* 2009.
 40. Jáuregui G. Efecto antibacteriano in vitro del colutorio a base de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) a diferentes concentraciones sobre la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus mutans*. Tesis de grado. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
 41. Acuña S. Crecimiento de *Streptococcus mutans* frente al colutorio experimental a base de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) a diferentes concentraciones comparado con el colutorio experimental de clorhexidina al 0,12%. Tesis de maestría. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2014.
 42. Cosco D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* (manzanilla). Título de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
 43. Macedo J, Pimentel M, De Oliveira J. Efectos citotóxico, genotóxico y mutagénico in vivo de la tintura de *Matricaria chamomilla* L. *Rev. Cuba. de Plantas Medicinales.* 2012; 17(2).
 44. Zambrano L, Buenaño M, Mancera N, Jiménez E. Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Univ. Salud.* 2015; 17(1).
 45. Federation WD. El Desafío de las Enfermedades Bucodentales – Una llamada a la acción global. Segunda ed. Federation WD, editor. Ginebra: Myriad Editions; 2015.
 46. Basso M. Conceptos actualizados en cariología. *Rev Asoc Odontol Argent.* 2019; 107: p. 25-32.
 47. Serrano H, Sánchez M, Cardona N. Knowledge of the microbiota of the oral cavity through the metagenomic. *Revista CES Odontología.* 2015; 28(2): p. 112 - 118.

48. Walsh T, Oliveira J, Moore D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015.
49. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2017; 7(1).
50. Bustillos W, Bueno Z. Inhibición de *Streptococcus mutans* aislado de cavidad oral de niños sin caries mediante sustancia antagónica producida por *Lactobacillus spp.* *Rev. odontopediatr. latinoam.* 2020 Junio; 10(1).
51. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med.* 2016; 77(4).
52. Cañigüeral S, Vanaclocha B. In *Fitoterapia. Vademécum de prescripción.*: Elsevier; 2019. p. 830.
53. Meza L, Dicoovski L. Uso potencial de la manzanilla *Matricaria chamomilla L.* y experiencias en Nicaragua. *El Higo.* 2020 Junio; 10(1).
54. Ortiz R, García L, Ocadiz M, Flores J, García A, González M, et al. *Matricaria chamomilla* (extracto acuoso) induce mejoría en lesiones tipo-dermatitis atópica en un modelo murino. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 2017 Diciembre; 55(5).
55. Hernández C, Aguilera J, Sandoval M. Infusión *Matricaria chamomilla* (manzanilla) como inhibidor del crecimiento de *Streptococcus mutans* en pacientes con tratamiento de ortodoncia. *CienciaCierta.* 2018 Junio;(54).
56. Talavera M. Efecto antibacteriano in vitro de infusión de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre *Streptococcus mutans* - Puno 2013. Tesis doctoral. Puno : Universidad Nacional del Altiplano; 2014.
57. Adom M, Taher M, Mutalabisina M, Amria M, Abdul Kudos M, Wan Sulaiman M, et al. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomed. Pharmacother.* 2017 Setiembre; 96.
58. Coronado G, Cauna P. Actividad inhibitoria in vitro de extractos hidroalcohólicos de *Plantago major* (llantén) y *Rumex crispus* (lengua de vaca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, Puno - 2017. Tesis de grado. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de ciencias biológicas; 2018.
59. Cabrera S, Martínez C, Ferro T, Giner P, Icart T, Estrada J, et al. Efficacy of *Plantago major*, chlorhexidine 0,12% and sodium bicarbonate 5% solution in the treatment of oral mucositis in cancer patients with solid tumour: A feasibility randomised triple-blind phase III clinical trial. *Eur J Oncol Nurs.* 2018; 32.

60. García J. Modelización del crecimiento y la producción de plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. en el noroeste de España. Tesis doctoral. Lugo, Departamento de Ingeniería Agroforestal; 2015.
61. Arteaga S, Dávila L, Gutiérrez R, Sosa L, Albarrán S, Isla M, et al. Efectividad del gel de manzanilla y llantén como terapia coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica. *Acta Bioclínica*. 2017; 7(13).
62. Stanojevic L, Marjanovic-Balaban Z, Kalaba V, Stanojevic J, Cvetkovic To D. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.). *J. Essent. Oil-Bear*. 2016 Diciembre; 19(8).
63. Pesantes S, Calla R, Requena M, Alvino M, Millones P. Chemical Composition and Antibacterial Effect of *Plantago Major* Extract on Periodontal Pathogens. *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clín. Integr*. 2018 Julio; 20.
64. Romeh A. Synergistic use of *Plantago major* and effective microorganisms, EM1 to clean up the soil polluted with imidacloprid under laboratory and field condition. *Int. J. Phytoremediation*. 2020 Julio; 2.
65. Amado N, Atusparia G, Huamán M, Méndez A, Prado E, Jurupe H, et al. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de las hojas de *Manihot esculenta* Crantz (yuca) en un modelo experimental de inflamación aguda. *Rev. Fac. Med. Hum*. 2020 Marzo; 20(1).
66. Morales A, Hernández J, Valladares B, Velázquez V, Delgadillo L, Rosenfeld C, et al. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitaria. *Abanico vet*. 2020 Junio; 10.
67. Benitez R, Sarria R, Gallo J, Pérez N, Álvarez J, Giraldo C. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Bistua*. 2019; 15(1).
68. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vigésima novena ed. Wayne: Institute Clinical and Laboratory Standards; 2019.
69. Yáñez X, Cuadro O. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua*. 2012; 10(1).
70. Teles D, Costa M. Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de *Tansagem* (*Plantago major* L., Plantaginaceae) e *Romã* (*Punica granatum* L., Punicaceae) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina in vitro. *Rev. bras. plantas med*. 2014; 16(2).

71. Valverde J. Efecto inhibitorio, in vitro, del extracto del *Plantago major* (llanten) frente a las cepas de *Streptococcus mutans*. Tesis de grado. Trujillo; 2018.
72. Fiestas I, Huanca F. Extracto hidroalcohólico de *Plantago major* L. y su efecto antibacteriano sobre cultivos de *Streptococcus pyogenes* estudios in vitro. Tesis de grado. Lima; Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímica; 2018.
73. Vásquez J. Eficacia inhibitoria entre el extracto metanólico de *Plantago major* (llantén) y clindamicina en colonias de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) in vitro. Tesis de grado. Cajamarca; Facultad de ciencias de la salud; 2018.
74. Silva A, Lobo L, Gonçalves J, Martines B, Pereira F, Leonardo L, et al. Antibiofilm and anti-caries effects of an experimental mouth rinse containing *Matricaria chamomilla* L. extract under microcosm biofilm on enamel. *J Dent*. 2020 Agosto; 99.
75. Sharma H, Yunus G, Mohapatra A, Kulshrestha R, Agrawal R, Kalra M. Antimicrobial efficacy of three medicinal plants *Glycyrrhiza glabra*, *Ficus religiosa*, and *Plantago major* on inhibiting primary plaque colonizers and periodontal pathogens: An in vitro study. *Indian J Dent Sci*. 2016; 27(2).

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de la elaboración de la parte experimental del estudio, por el Centro de Investigaciones Biomédicas (InvBiomed S.R.L.)



"La Ciencia al Servicio de tu Salud"

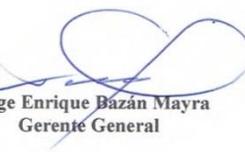
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
LABORATORIO "INVBIO MED" S.R.L.
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Cajamarca, 31 de agosto de 2020

CERTIFICADO

Certifico que la Señorita **Bach. Lysanne Del Carmen Carranza Villaty**, realizó el trabajo experimental in vitro que busca determinar el efecto sinérgico de la combinación de extractos de *Plantago major*, *Eucaliptus globulus* y *Matricaria chamomilla*, en diferentes concentraciones (100%, 50%, 25% y 12.5%), en la inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), por método de disco difusión, en 10 repeticiones cada uno; así también la medición de los halos de inhibición que estos presentaran para su trabajo final de tesis,

Actividades que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Laboratorio InvBiomed S.R.L.



Jorge Enrique Bazán Mayra
Gerente General

 Av. Mario Urteaga N° 361 - Interior 1
Frente al Colegio "Santa Teresita"
 (076)260219 / 938250152
Claro: 976163311 / 976089457
 invbiomed.cajamarca@gmail.com

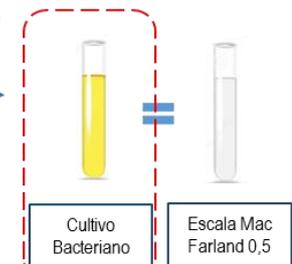
N° 16808

Anexo 2. Protocolo: Efecto sinérgico de combinación de extractos de “manzanilla”, “llantén” y “eucalipto” sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) *in vitro*

1 ACTIVACIÓN DE CEPA ATCC

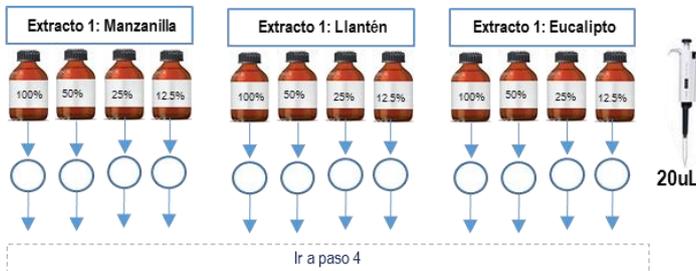


2 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO:



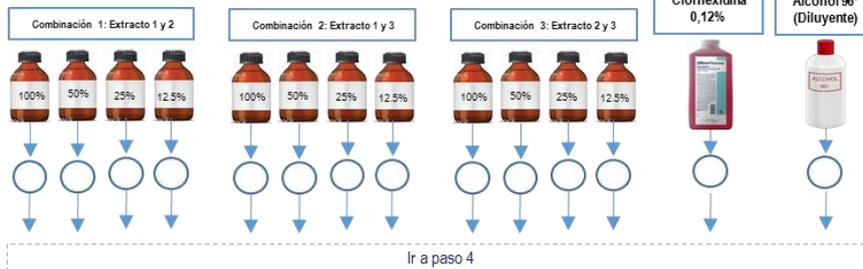
3 IMPREGNACIÓN DE DISCOS

Grupo Problema 0:



Sembrar en placas de agar sangre suplementado (Paso 4)

Grupo Problema 1, 2 y 3:



4 MÉTODO DE DISCOS DIFUSIÓN

Grupo Problema 0:



Grupo Problema 1, 2 y 3:



INCUBACIÓN: En incubadora de 35°C x 24 horas – ambiente de microaerofilia

Realizar 10 repeticiones

5 LECTURA E INTERPRETACIÓN

Medir halos de inhibición en mm



**Anexo 3. Certificación de cepa estandarizada *Streptococcus mutans*
(ATCC 25175) obtenida del laboratorio GenLab - Lima, Perú**



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-30** Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2019/8/15
--	---

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 Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

**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.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Anexo 4. Protocolo de activación de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)



INSTRUCCIONES CON ILUSTRACIONES

- 1**

Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
- 2**

Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquese a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
- 3**

Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agriete la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- 4**

Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- 5**

Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- 6**

De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transféralo al medio con agar correspondiente o utilícelo según el procedimiento operativo estándar del laboratorio.
- 7**

Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 8**

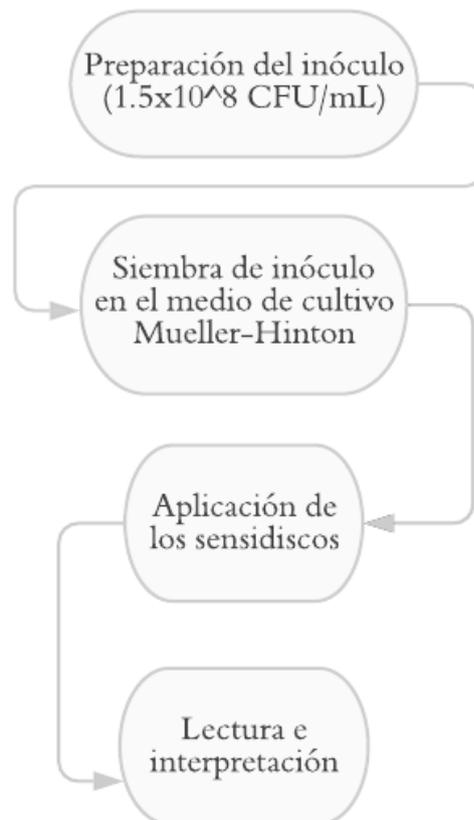
Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.
- 9**

Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- 10**

De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.

Para ver el método de cultivo ingrese a la página del producto en www.microbiologics.com.

**Anexo 5. Flujograma del fundamento de difusión en disco,
según Kirby Bauer**



Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. Test de difusión en agar con discos, diámetros de halos de inhibición de colonias de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) según diferentes concentraciones de los extractos

DISCO Concentración de Manzanilla	Diámetros de halos de inhibición (mm)										
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	Promedio (mm)
12,5%											
25%											
50%											
100%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											
DISCO Concentración de Llantén	Diámetros de halos de inhibición (mm)										
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	Promedio (mm)
12,5%											
25%											
50%											
100%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											
DISCO Concentración de Eucalipto	Diámetros de halos de inhibición (mm)										
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	Promedio (mm)
12,5%											
25%											
50%											
100%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											

C+	Control Positivo: Gluconato de Clorhexidina 0,2%
C-	Control Negativo: Alcohol 96°
Cc	Control de crecimiento - cultivo puro
Ce	Control de esterilidad del medio

Anexo 6. Test de difusión en agar con discos, diámetros de halos de inhibición de colonias de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) según diferentes concentraciones de los extractos

DISCO Concentración de Manzanilla + Llantén	Diámetros de halos de inhibición (mm)										
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	Promedio (mm)
12,5%											
25%											
50%											
100%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											
DISCO Concentración de Manzanilla + Eucalipto	Diámetros de halos de inhibición (mm)										
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	Promedio (mm)
12,5%											
25%											
50%											
100%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											
DISCO Concentración de Llantén + Eucalipto	Diámetros de halos de inhibición (mm)										
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	Promedio (mm)
12,5%											
25%											
50%											
100%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											

C+	Control Positivo: Gluconato de Clorhexidina 0,2%
C-	Control Negativo: Alcohol 96°
Cc	Control de crecimiento - cultivo puro
Ce	Control de esterilidad del medio

Anexo 7. Matriz de operalización de las variables

VARIABLE	INDICADOR	VALORES	ESCALA
<p>Independiente:</p> <p>Soluciones porcentuales de extracto hidroalcohólico puro y en combinación de <i>Plantago major</i>, <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Matricaria chamomilla</i></p>	<p>Concentraciones del extracto hidroalcohólico</p>	<p>100%</p> <p>50%</p> <p>25%</p> <p>12,5%</p>	<p>Nominal</p>
<p>Dependiente:</p> <p>Inhibición bacteriana <i>in vitro</i> frente a colonias de la cepa <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)</p>	<p>Medida del diámetro del halo de inhibición (escala de Duraffourd)</p>	<p>Sensibilidad nula (-): diámetro < 8 mm</p> <p>Sensible (+): diámetro ≥ 8 mm y ≤ 14 mm</p> <p>Muy sensible (++): diámetro > 14 mm y ≤ 20 mm</p> <p>Sumamente sensible (+++): diámetro > 20 mm</p>	<p>Ordinal</p>

Fuente: Elaboración propia

Anexo 8. Tablas

Tabla 1 Efecto sinérgico *in vitro* en concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100%) de la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); y *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas *S. mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones		Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY		
			g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
							1	2
12,5%	“manzanilla” + “llantén”	6,4	2	0,130	0,878	10	6,4	
	“manzanilla” + “eucalipto”	6,3				10	6,3	
	“eucalipto” + “llantén”	6,4				10	6,4	
25%	“manzanilla” + “llantén”	6,4	2	0,500	0,612	10	6,4	
	“manzanilla” + “eucalipto”	6,4				10	6,4	
	“eucalipto” + “llantén”	6,6				10	6,6	
50%	“manzanilla” + “llantén”	6,5	2	13,431	0,000	10	6,5	
	“manzanilla” + “eucalipto”	6,8				10	6,8	
	“eucalipto” + “llantén”	7,6				10		7,6
100%	“manzanilla” + “llantén”	6,7	2	11,488	0,000	10	6,7	
	“manzanilla” + “eucalipto”	7,5				10	7,5	
	“eucalipto” + “llantén”	8,4				10		8,4
C+		11,2	2	0,122	0,886	10	11,2	11,2
C-		6	2	0,122	0,886	10	6	6

Tabla 2 Efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* en concentraciones (12,5%, 25%, 50%, 100%) de los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *S. mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones		Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY		
			g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
							1	2
12,5%	“manzanilla”	6,5	2	0,593	0,560	10	6,5	
	“llantén”	6,9				10	6,9	
	“eucalipto”	6,9				10	6,9	
25%	“llantén”	6,6	2	3,651	0,040	10	6,6	
	“manzanilla”	6,7				10	6,7	6,7
	“eucalipto”	7,3				10		7,3
50%	“llantén”	6,7	2	7,855	0,002	10	6,7	
	“manzanilla”	7,1				10	7,1	7,1
	“eucalipto”	7,5				10		7,5
100%	“llantén”	6,8	2	12,319	0,000	10	6,8	
	“manzanilla”	7,7				10		7,7
	“eucalipto”	8,4				10		8,4
C+		12,76	2	6,217	0,006	10	12,76	12,76
C-		6	2	0,122	0,886	10	6	6

Tabla 3 Diámetro de halo de inhibición según la escala de Duraffourd para extractos en combinación

Concentraciones		Halo inhibitorio (Promedio)	Escala de Duraffourd
12,5%	“manzanilla” + “llantén”	6.4	(-)
	“manzanilla” + “eucalipto”	6.3	(-)
	“eucalipto” + “llantén”	6.4	(-)
25%	“manzanilla” + “llantén”	6.4	(-)
	“manzanilla” + “eucalipto”	6.4	(-)
	“eucalipto” + “llantén”	6.6	(-)
50%	“manzanilla” + “llantén”	6.5	(-)
	“manzanilla” + “eucalipto”	6.8	(-)
	“eucalipto” + “llantén”	7.6	(-)
100%	“manzanilla” + “llantén”	6.7	(-)
	“manzanilla” + “eucalipto”	7.5	(-)
	“eucalipto” + “llantén”	8.4	(+)
C+	Control positivo	11,2	(+)
C-	Control negativo	6	(-)

Fuente: Elaboración de la investigadora

Tabla 4 Diámetro de halo de inhibición según la escala de Duraffourd para extractos puros

Concentraciones		Halo inhibitorio (Promedio)	Escala de Duraffourd
12,5%	“manzanilla”	6.5	(-)
	“llantén”	6.9	(-)
	“eucalipto”	6.9	(-)
25%	“llantén”	6.6	(-)
	“manzanilla”	6.7	(-)
	“eucalipto”	7.3	(-)
50%	“llantén”	6.7	(-)
	“manzanilla”	7.1	(-)
	“eucalipto”	7.5	(-)
100%	“llantén”	6.8	(-)
	“manzanilla”	7.7	(-)
	“eucalipto”	8.4	(+)
C+	Control positivo	12,76	(+)
C-	Control negativo	6	(-)

Fuente: Elaboración de la investigadora

Tabla 5 ANOVA del efecto sinérgico *in vitro* de la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones	Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY		
		g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
						1	2
12,5%	6,4	4	88,526	0,000	10	6,4	
25%	6,4				10	6,4	
50%	6,5				10	6,5	
100%	6,7				10	6,7	
C+	11,3				10		11,3

p<0,05: Existe diferencias significativas entre las medias

Tabla 6 ANOVA del efecto sinérgico *in vitro* de la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones	Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY			
		g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
						1	2	3
12,5%	6,3	4	92,469	0,000	10	6,3		
25%	6,4				10	6,4		
50%	6,8				10	6,8	6,8	
100%	7,5				10		7,5	
C+	11,1				10			11,1

p<0,05: Existe diferencias significativas entre las medias

Tabla 7 ANOVA del efecto sinérgico *in vitro* de la combinación del extracto de *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones	Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY			
		g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
						1	2	3
12,5%	6,4	4	89,142	0,000	10	6,4		
25%	6,6				10	6,6		
50%	7,6				10		7,6	
100%	8,4				10		8,4	
C+	11,2				10			11,2

p<0,05: Existe diferencias significativas entre las medias

Tabla 8 ANOVA del efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones	Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY		
		g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
						1	2
12,5%	6,5	4	57,304	0,000	10	6,5	
25%	6,7				10	6,7	
50%	7,1				10	7,1	
100%	7,7				10	7,7	
C+	12,1				10		12,1

p<0,05: Existe diferencias significativas entre las medias

Tabla 9 ANOVA del efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* del extracto de *Plantago major* (llantén), sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones	Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY		
		g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
						1	2
12,5%	6,9	4	95,073	0,000	10	6,9	
25%	6,6				10	6,6	
50%	6,7				10	6,7	
100%	6,8				10	6,8	
C+	14,2				10		14,2

p<0,05: Existe diferencias significativas entre las medias

Tabla 10 ANOVA del efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* del extracto de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Concentraciones	Halo inhibitorio (Promedio)	ANOVA			TUKEY			
		g.l.	F	p-value	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
						1	2	3
12,5%	6,9	4	67,488	0,000	10	6,9		
25%	7,3				10	7,3		
50%	7,5				10	7,5	7,5	
100%	8,4				10		8,4	
C+	11,95				10			12,0

p<0,05: Existe diferencias significativas entre las medias

Tabla 11 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para *Matricaria chamomilla*

Concentración	Prueba de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	g.l.	Sig.	Estadístico	g.l.	Sig.
12,5%	0,329	10	0,003	0,655	10	0,000
25%	0,302	10	0,010	0,781	10	0,008
50%	0,524	10	0,000	0,366	10	0,000
100%	0,272	10	0,035	0,802	10	0,015
C+	0,222	10	0,176	0,888	10	0,160

p> 0,05: Cumple criterio de normalidad

Tabla 12 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para *Plantago major*

Concentración	Prueba de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	g.l.	Sig.	Estadístico	g.l.	Sig.
12,5%	0,374	10	0,000	0,611	10	0,000
25%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
50%	0,433	10	0,000	0,594	10	0,000
100%	0,324	10	0,004	0,794	10	0,012
C+	0,189	10	0,200	0,873	10	0,109

p> 0,05: Cumple criterio de normalidad

Tabla 13 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para *Eucalyptus globulus*

Concentración	Prueba de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	g.l.	Sig.	Estadístico	g.l.	Sig.
12,5%	0,524	10	0,000	0,366	10	0,000
25%	0,433	10	0,000	0,594	10	0,000
50%	0,329	10	0,003	0,655	10	0,000
100%	0,282	10	0,023	0,890	10	0,172
C+	0,185	10	0,200	0,915	10	0,318

p> 0,05: Cumple criterio de normalidad

Tabla 14 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para *Matricaria chamomilla* + *Plantago major*

Concentración	Prueba de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	g.l.	Sig.	Estadístico	g.l.	Sig.
12,5%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
25%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
50%	0,329	10	0,003	0,655	10	0,000
100%	0,302	10	0,010	0,781	10	0,008
C+	0,246	10	0,089	0,874	10	0,111

p> 0,05: Cumple criterio de normalidad

Tabla 15 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk *Matricaria chamomilla* + *Eucalyptus globulus*

Concentración	Prueba de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	g.l.	Sig.	Estadístico	g.l.	Sig.
12,5%	0,433	10	0,000	0,594	10	0,000
25%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
50%	0,482	10	0,000	0,509	10	0,000
100%	0,222	10	0,178	0,906	10	0,258
C+	0,248	10	0,082	0,805	10	0,017

p> 0,05: Cumple criterio de normalidad

Tabla 16 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para *Eucalyptus globulus* + *Plantago major*

Concentración	Prueba de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	g.l.	Sig.	Estadístico	g.l.	Sig.
12,5%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
25%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
50%	0,381	10	0,000	0,640	10	0,000
100%	0,305	10	0,009	0,781	10	0,008
C+	0,232	10	0,136	0,804	10	0,106

p> 0,05: Cumple criterio de normalidad

Anexo 9. Gráficos

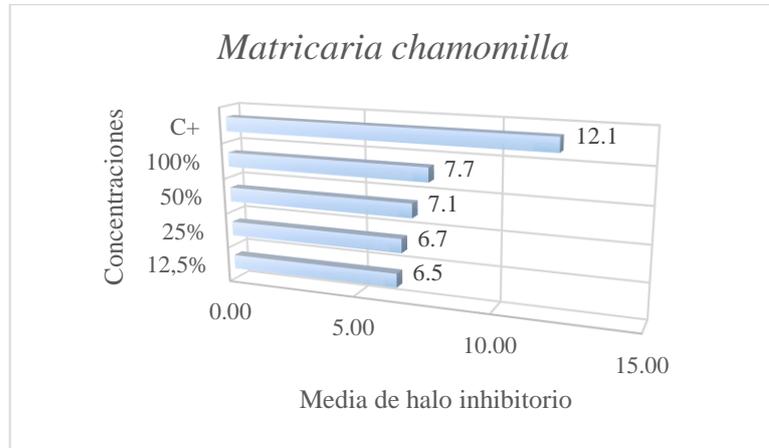


Gráfico 3 Efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

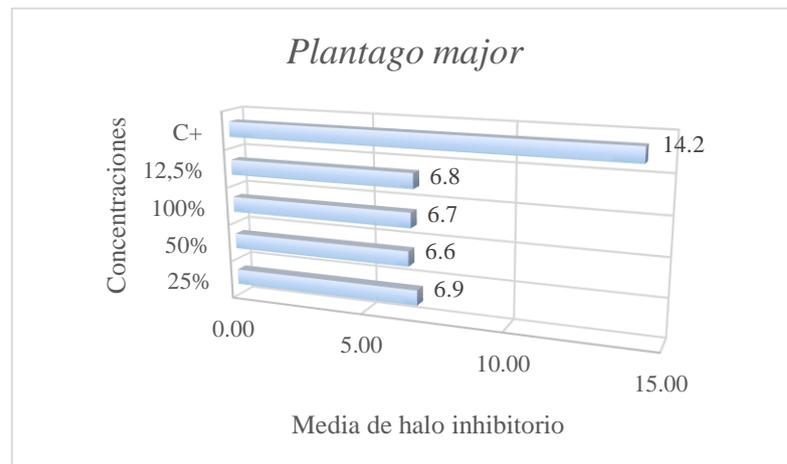


Gráfico 4 Efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* del extracto de *Plantago major* (llantén), sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

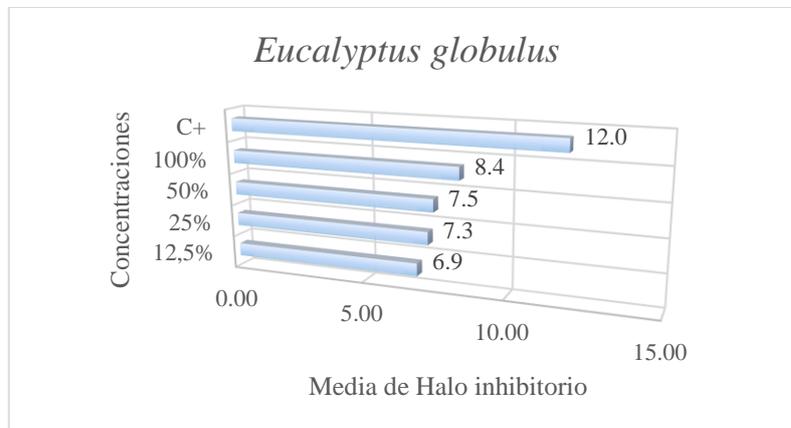


Gráfico 5 Efecto inhibitorio del crecimiento *in vitro* del extracto de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

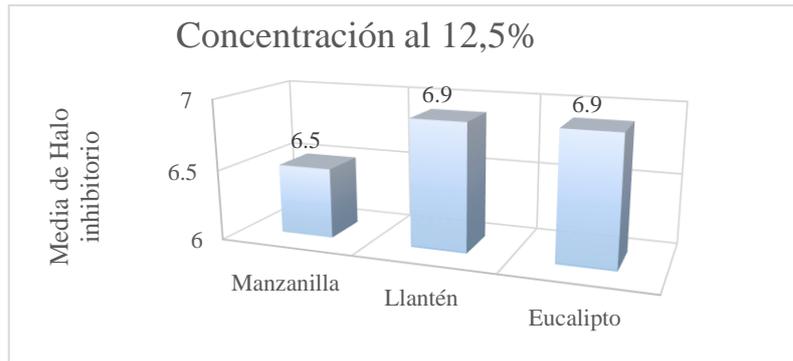


Gráfico 6 Efecto inhibitorio *in vitro* a la concentración 12,5% de los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas *S. mutans* (ATCC 25175)

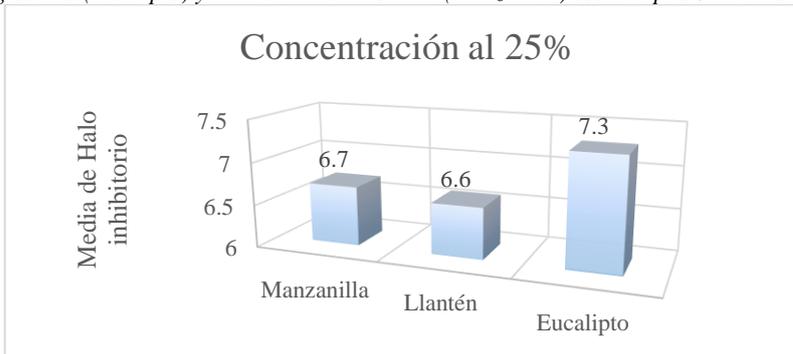


Gráfico 7 Efecto inhibitorio *in vitro* a la concentración 25% de los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas *S. mutans* (ATCC 25175)

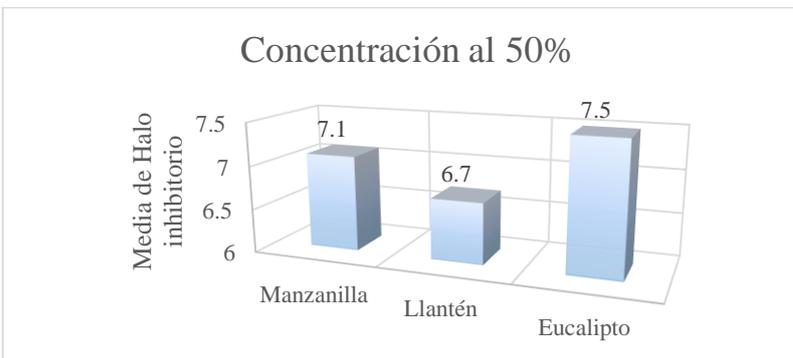


Gráfico 8 Efecto inhibitorio *in vitro* a la concentración 50% de los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas *S. mutans* (ATCC 25175)

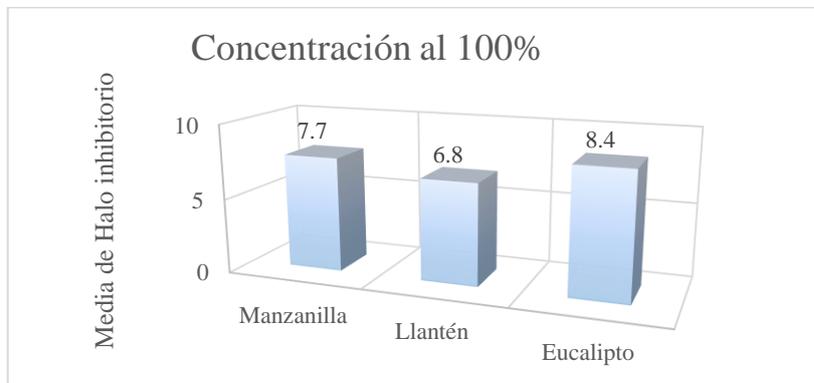


Gráfico 9 Efecto inhibitorio *in vitro* a la concentración 100% de los extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas *S. mutans* (ATCC 25175)

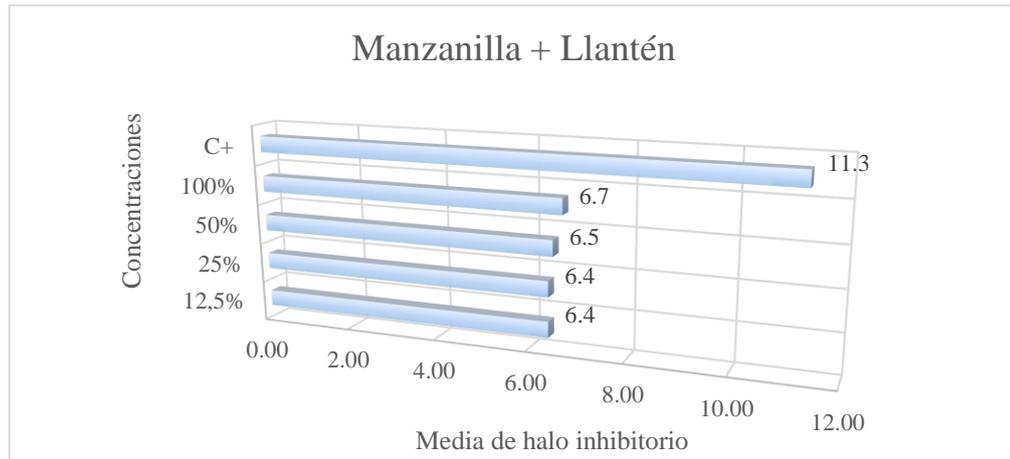


Gráfico 10 Efecto sinérgico *in vitro* de la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* y *Plantago major*; en la inhibición del crecimiento de cepas de *S. mutans* (ATCC 25175)

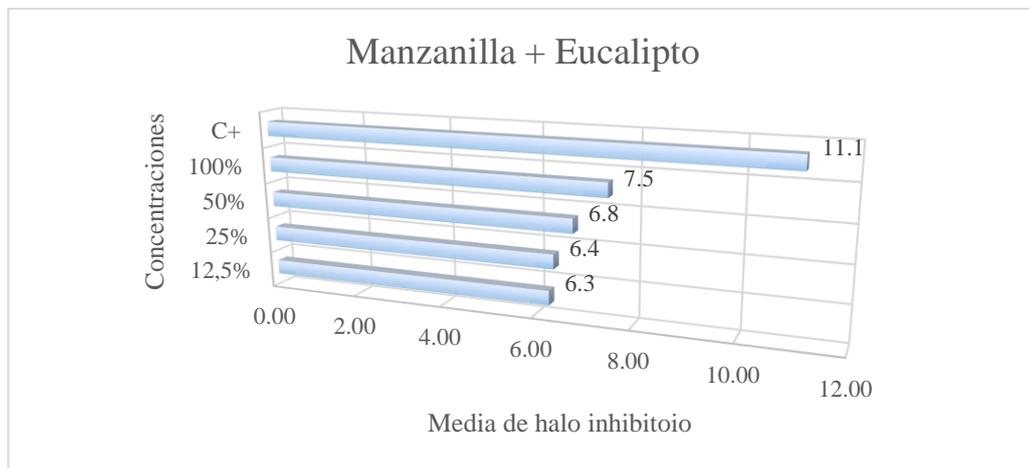


Gráfico 11 Efecto sinérgico *in vitro* de la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* y *Eucalyptus globulus*; en la inhibición del crecimiento de cepas de *S. mutans* (ATCC 25175)

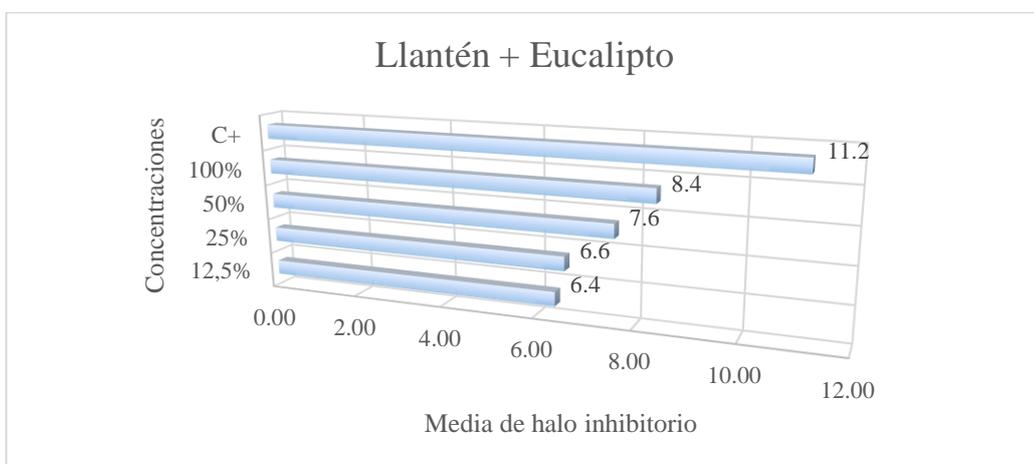


Gráfico 12 Efecto sinérgico *in vitro* de la combinación del extracto de *Plantago major* y *Eucalyptus globulus*; en la inhibición del crecimiento de cepas de *S. mutans* (ATCC 25175)

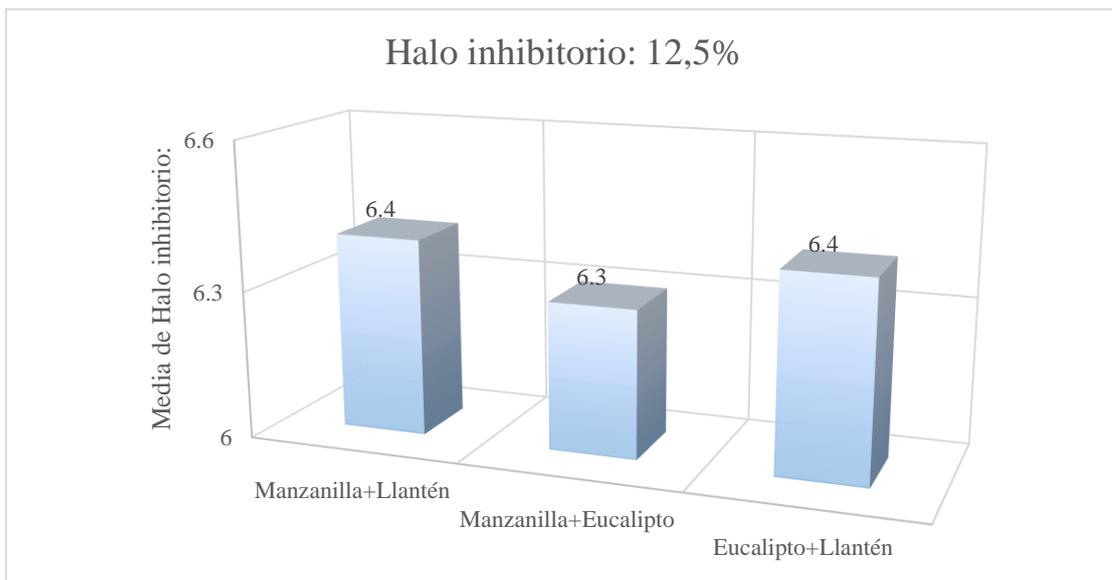


Gráfico 13 Efecto sinérgico *in vitro* en la concentración de 12,5% según lo combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

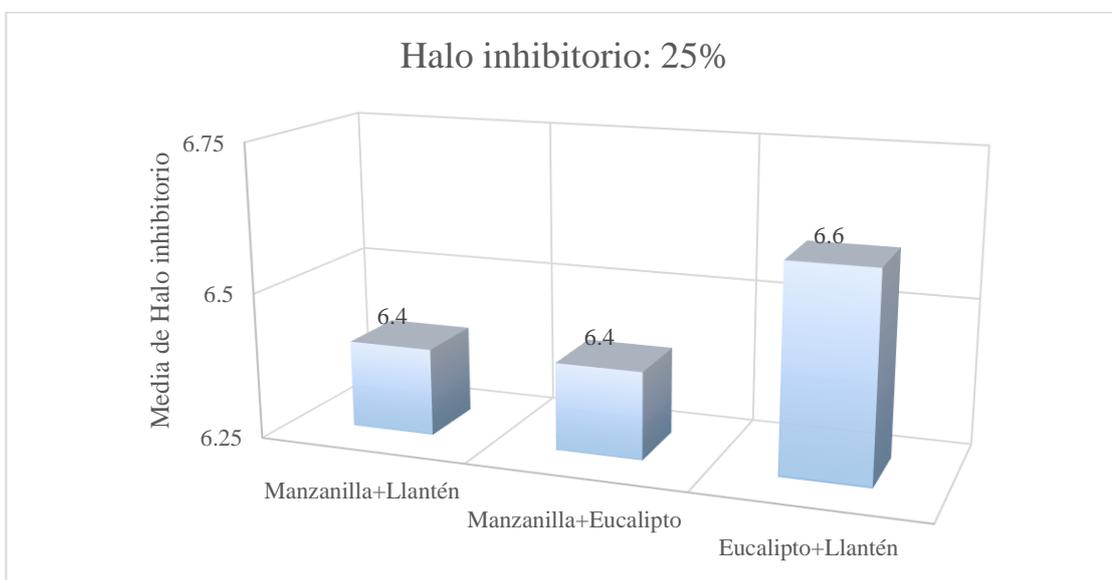


Gráfico 14 Efecto sinérgico *in vitro* en la concentración de 25% según lo combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

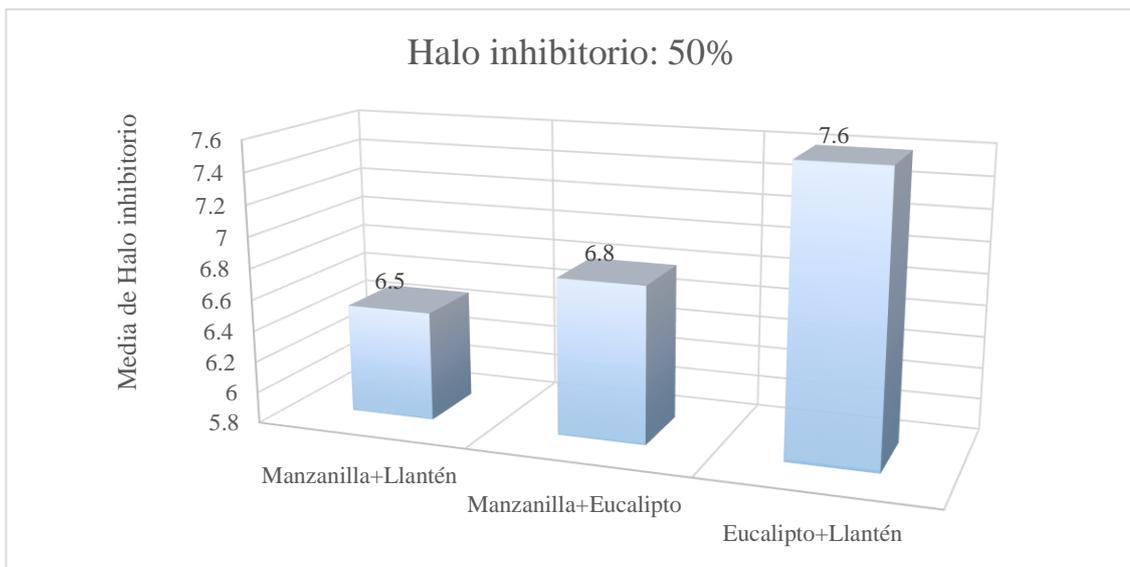


Gráfico 15 Efecto sinérgico *in vitro* en la concentración de 50% según lo combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

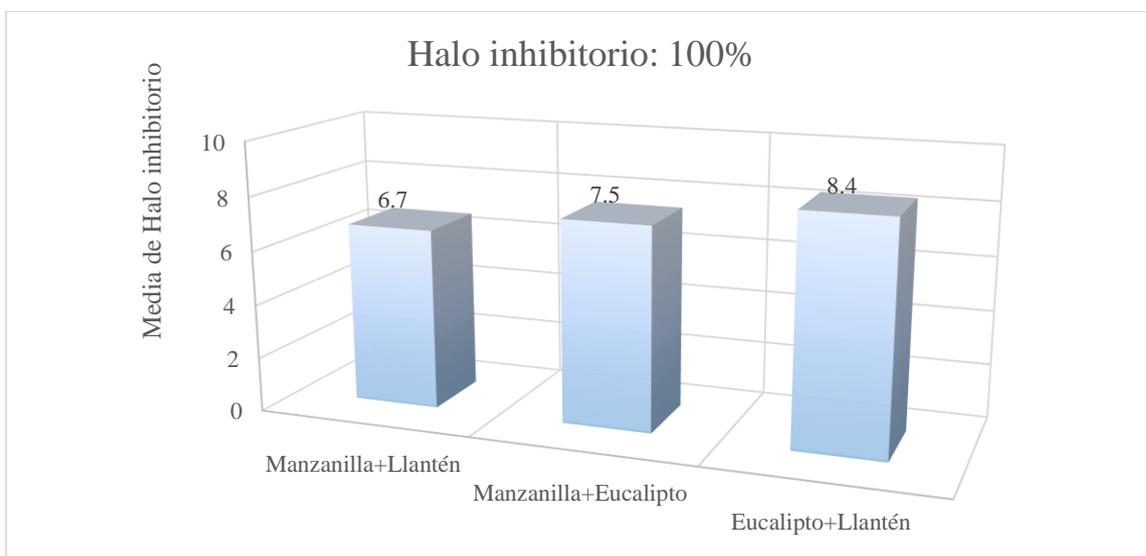


Gráfico 16 Efecto sinérgico *in vitro* en la concentración de 12,5% según la combinación del extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Plantago major* (llantén); *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); *Plantago major* (llantén) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Anexo 10. Figuras

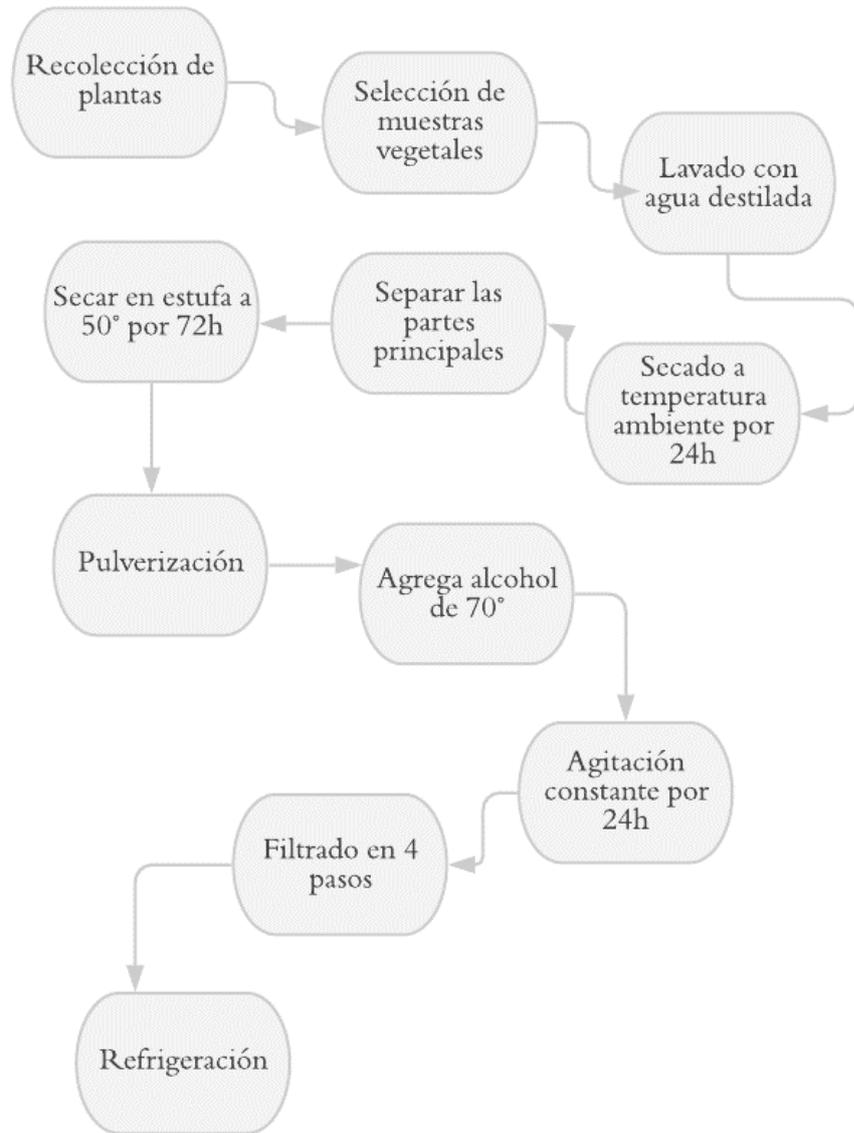


Figura 1 Flujograma de obtención de extractos hidroalcohólicos



Figura 2 Recolección de las plantas. A. "Llantén" en el distrito de Jesús, Cajamarca B. "Eucalipto" en el centro poblado Otuzco, Cajamarca C. "Manzanilla" en el distrito de Namora, Cajamarca



Figura 4 Secado de 500 g de cada planta, en estufa a 56° por 72 horas

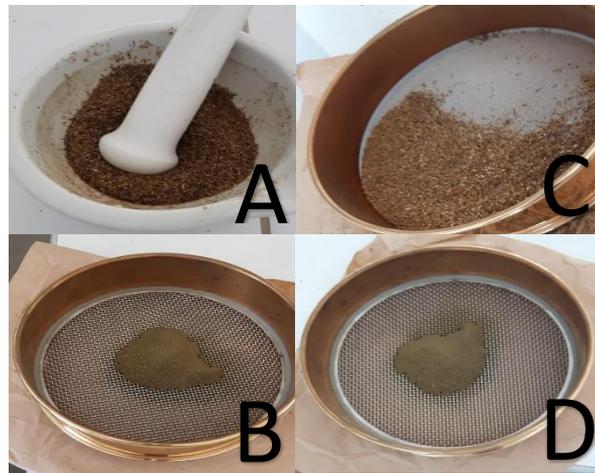


Figura 3 Pulverización de cada planta en mortero y en tamiz n.º 40



Figura 6 Método por agitación constante, 300 revoluciones/minuto por 24 horas
A. *Eucalyptus globulus* B. *Matricaria chamomilla* C. *Plantago major*



Figura 5 Filtrado de cada extracto



Figura 9 Pesado de 4,2 g de agar Mueller-Hinton (marca Merck KGaA) con 200 mL de agua destilada



Figura 7 Cepa estandarizada *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)



Figura 8 Incubación de la cepa *S. mutans* por 15 minutos a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$



Figura 10 Sembrado de cepa *S. mutans* en agar sangre de carnero desfibrinada (5%)



Figura 11 Incubación en condiciones de microaerofilia a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas



Figura 12 Cultivo de *S. mutans* luego de 24 horas de incubación

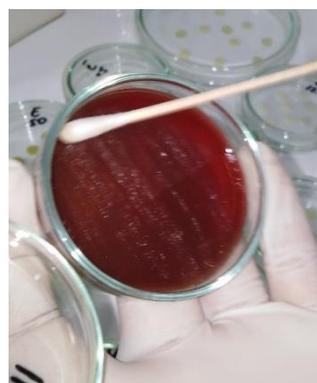


Figura 13 Colocación de colonias de la cepa *S. mutans* en 4 mL de caldo Mueller-Hinton



Figura 14 Turbidez final de 0,5 en la escala McFarland

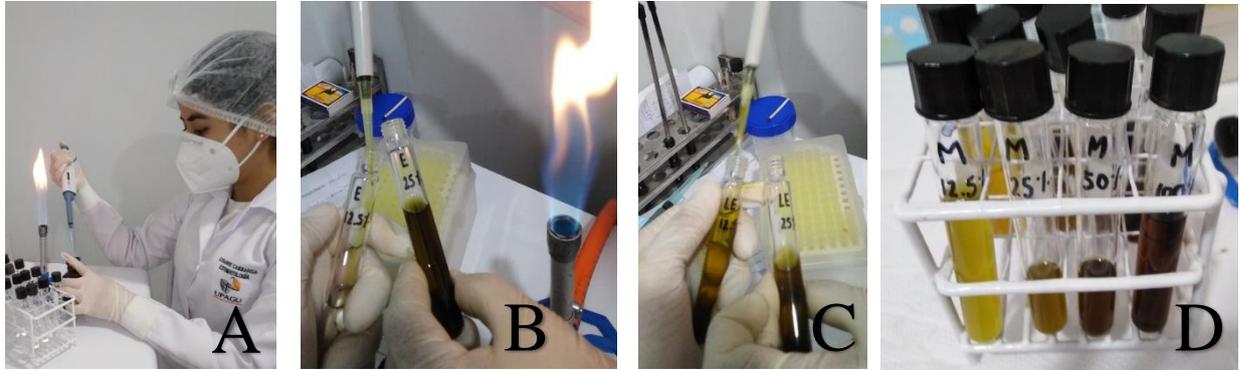


Figura 15 A. Preparación de las diluciones B. Dilución de extractos puros C. Dilución de extractos combinados D. Diluciones al 100%, 50%, 25%, 12,5% de extractos puros y en combinaciones

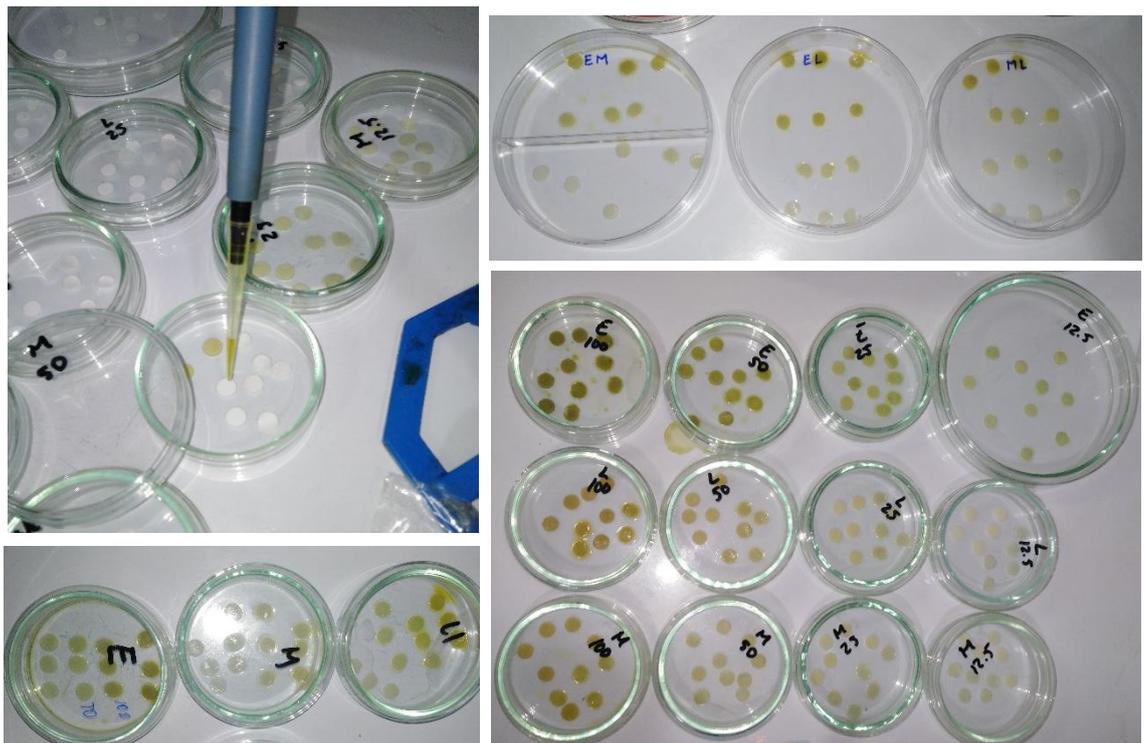


Figura 16 Impregnación de 50 µL de cada extracto, en las diferentes diluciones

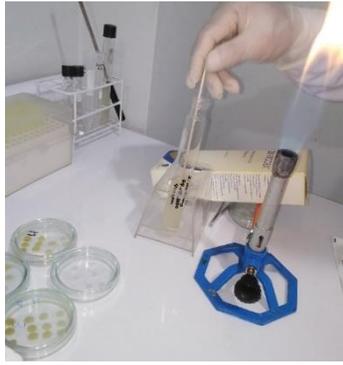


Figura 17 Inoculación de la superficie de las placas de Petri conteniendo agar sangre, por rayado con el hisopo en tres direcciones con rotaciones de 60° aproximadamente, y sobre los bordes del agar como paso final

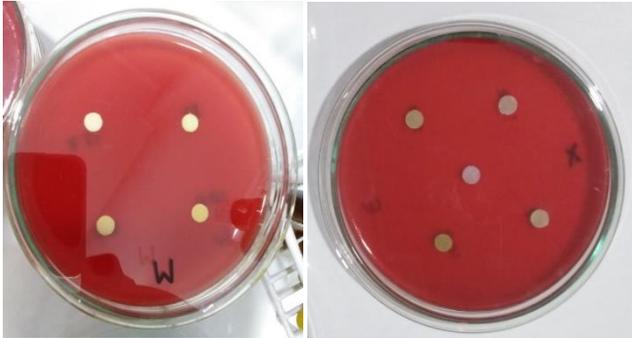


Figura 19 Colocación de los discos impregnados en extractos sobre las placas de Petri



Figura 18 Placas invertidas en ambiente de microaerofilia para incubación a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Incubadoras Memmert)

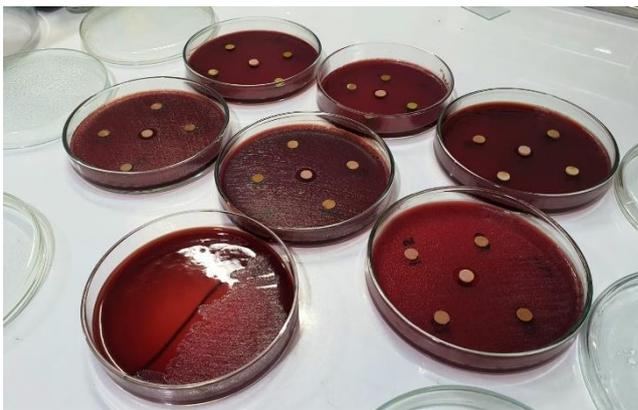


Figura 21 Placas de Petri luego de 24 horas en incubación

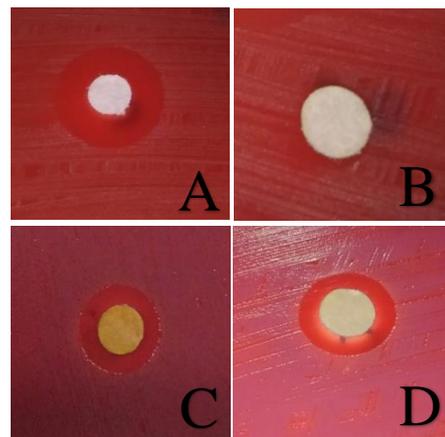


Figura 20 Halos de inhibición: A. Control positivo, B. Control Negativo, C. *Eucalyptus globulus* al 100%; D. Combinación de *Eucalyptus globulus* y *Plantago major* al 100%