

Efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175

In vitro inhibitory effect of essential oil of *Shinus molle* L. “molle” on *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Italo W. Cedamanos Gutiérrez¹, Elva M. Mejía Delgado²

Recibido: 15 de noviembre de 2014

Aceptado: 12 de diciembre de 2014

Resumen

Debido que masticar las hojas del *Shinus molle* L. disminuye la movilidad dental, trata la enfermedad periodontal, evita la halitosis y desinflama la boca (encía), se planteó ¿cuál es el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175? para contribuir al tratamiento y prevención de patologías médicas. Se realizaron 32 repeticiones de prueba de sensibilidad a antimicrobianos por dilución (concentración mínima inhibitoria) y difusión (susceptibilidad bacteriana) del aceite esencial a concentraciones 0, 25, 50, 75 y 100%, y al grupo control (Bencilpenicilina procaínica 1000000 UI), procesando datos mediante pruebas estadísticas. Los

resultados son los siguientes: la concentración mínima inhibitoria fue 25% y sin diferencia significativa entre 25, 50, 75 y 100%; no se observaron halos de inhibición en la susceptibilidad bacteriana con la técnica de Kirby y Bauer; las concentraciones tuvieron efecto inhibitorio positivo sobre el *Streptococcus mutans*. La conclusión es que la concentración mínima inhibitoria es 25%; con la técnica de Kirby y Bauer la bacteria es resistente y las concentraciones tienen efecto inhibitorio.

Palabra Clave: Aceite esencial, *Shinus molle* L., *Streptococcus mutans*.

Abstract

As *Shinus molle* L.'s leaves by chewing reduces tooth mobility, treat periodontal disease, halitosis prevents and relieves mouth (gums), was raised What is the inhibitory effect *in vitro* of essential oil of *Shinus molle* L. “molle” on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ?, to help in the treatment and prevention of medical pathologies. 32 replicates were performed of antimicrobial sensitivity testing by dilution (minimum inhibitory concentration) and dissemination (bacterial susceptibility) essential oil at concentrations 0, 25, 50, 75 and 100%, and the control group (procaine benzylpenicillin 1000000 UI), processing data using statistical tests. The re-

sults are: the minimum inhibitory concentration was 25% and and no significant difference between 25, 50, 75 and 100%; in bacterial susceptibility no were observed inhibition halos with Kirby and Bauer technique; y concentrations were positive inhibitory effect on *Streptococcus mutans*. Concluding: the minimum inhibitory concentration is 25%; with Kirby and Bauer technique, the bacteria are resistant; y the concentrations have inhibitory effect.

Keyword: Essential oil, ethanol extract, *Shinus molle* L., *Streptococcus mutans*, minimal inhibitory concentration and bacterial susceptibility.

1. Doctor en Estomatología. Profesor de la Escuela de Estomatología – UPAO

2. Microbióloga. Doctora en ciencias con mención en biomédicas. Docente del curso de Inmunología de la Universidad Privada Antenor Orrego.

I. INTRODUCCIÓN

A pesar que la medicina tradicional testifica que las hojas frescas masticadas del *Shinus molle* L. disminuyen la movilidad dental, trata la enfermedad periodontal, evita la halitosis y desinflama la boca (encía)¹, no hay estudios *in vitro* que planteen cuál es el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se conoce que los efectos los producen los principios activos de los vegetales¹.

Los principios activos que contiene el *Shinus molle* L. son: 1) monoterpenos, 2) triterpenos, 3) sesquiterpenos, 4) lípidos, 5) enzimas, 6) alcaloide, 7) flavonoides, 8) tanino, 9) “sustancia *Shinus molle* L.” con $C_{24}H_{48}O_2$ como fórmula global¹, 10) beta-sistosterol², 10) productos de terpenos y 11) ácidos grasos³. Para utilizarlos se recurre frecuentemente a extraerlo como aceite esencial⁴.

Por lo expuesto, para entender el efecto del aceite esencial del *Shinus molle* L. sobre el *Streptococcus mutans* *in vitro* se realiza un análisis desde el enfoque de la farmacognosia general.

El aceite esencial es obtenido del vegetal fresco^{5,6} que varía cualitativa y cuantitativamente dependiendo del origen botánico; suelen ser solubles en altas concentraciones de alcohol; se degradan químicamente en presencia de luz solar, aire, calor, ácidos y álcalis fuertes⁶. Sus componentes son: 1) Los terpenoides (más abundantes^{7,8}) que presentan las siguientes características: 1a) los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos y sesquiterpenos y 1b) los que poseen oxígeno como los terpenos funcionalizados con función fenol, alcohol, aldehído, cetona, éter, ester o peróxido. 2) Los no terpenoides: 2a) sustancias volátiles alifáticas que suelen ser hidrocarburos o sustancias con función oxigenada, 2b) sustancias volátiles aromáticas: 2b1) sustancias con estructuras C6-C1; 2b2) sustancias con estructuras C6-C3 (derivados de fenilpropano); 2b3) derivados cumarínicos. Las sustancias C6-C1 y C6-C3 son de bajo peso molecular, generalmente oxigenadas, con funciones alcohol, fenol, ácido, éter. 3) Las sustancias nitrogenadas. 4) Las sustancias con azufre⁶.

En el aceite esencial del *Shinus molle* L. se encontraron compuestos mayoritarios en monoterpenos (90,2%) [α -felandreno (33,5), β -mirceeno (25,7), silvestreno (23,5), p -cimeno (4,8) y α -pineno (2,7%)]⁹.

Los principios activos presentes son terpenos solubles en solventes orgánicos¹⁰, típicos constituyentes del aceite esencial⁶ e incluyen compuestos con actividades farmacológicas importantes como esteroides, saponinas, heterósidos cardíacos y terpenos modificados.^{5,7} Los monoterpenos regu-

lares constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales y conjuntamente con los sesquiterpenos responsables de sus propiedades farmacológicas⁷.

Las saponinas son difíciles de cristalizar⁷, al extraerlas con agua generalmente se realiza por ebullición⁹. Las lactonas sesquiterpénicas son de escasa presencia al extraerlas por hidrodestilación y algunas son inhibidores del crecimiento de bacterias, etc.^{5,7} Destacan por su actividad antimicrobiana los derivados terpénicos oxidados⁷.

Igualmente, alcaloides no oxigenados suelen ser líquidos arrastrables en corriente de vapor de agua (conina, nicotina, esparteína, etc).^{6,7} La berberina, benzofenandridinas y protopinas tienen propiedades antimicrobianas⁷ y la carpaina es antibacteriana⁵.

Finalmente, los polifenoles según su estructura química básica son taninos, ácido fenólico, ligninas⁵, flavonoides, cumarinas, cromenos y benzofuranos, xantonas y quinonas^{5,7}. Los fenoles son en principio solubles en disolventes orgánicos polares y desarrollan efectos farmacológicos⁸. Los cromenos y benzofuranos se extraen por destilación con poca efectividad comparada con solventes orgánicos y algunos son bacteriostáticos como el toxol y dehidrotrementona⁵. Los derivados quinónicos como benzoquinonas, naftoquinonas son arrastrables en corriente de vapor de agua.^{5,8} Diversas naftoquinonas poseen propiedades antibacterianas^{6,7}, como la yuglona empleada en afecciones de la cavidad bucal y faringe⁷ y al lapachol como bacteriostático^{5,7}.

El *Streptococcus mutans*, patógeno primario de la caries dental¹¹, al predominar en la profundidad de la cavidad cariosa es uno de los responsables de la lesión inicial de la pulpa¹², causante importante de las endocarditis subagudas^{11,12}; uno de los principales microorganismos aislados en abscesos cerebrales¹³; uno de los dos causantes de la estomatitis sub-protésica¹⁴. Durante el tratamiento ortodóntico activo aumentan en la placa¹⁵.

El efecto de *Shinus molle* L. sobre el *Streptococcus mutans* *in vitro* indicará con certeza cuál es su comportamiento real sobre el *Streptococcus mutans*¹¹.

Por tanto, con el propósito de conocer el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, esta investigación se propone los siguientes objetivos: 1) determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175; 2) determinar la susceptibilidad *in vitro* del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle”, al aplicar la técnica de Kirby y Bauer; 3)

determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. "molle" sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, según concentraciones. Finalmente, la hipótesis establece que el aceite esencial de las hojas del *Shinus molle* L. tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Al verificar el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Shinus molle* L. sobre el *S. mutans*, esta investigación empleará la medicina tradicional contra las patologías y/o infecciones producidas en el hombre por el *Streptococcus mutans*. Además, al ser abundante en América Latina su uso como ingrediente en los medicamentos estomatológicos, el *Shinus molle* L. reduciría los altos costos en los tratamientos de prevención y rehabilitación.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Biológico es la Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y botánico son las hojas de *Shinus molle* L.

Métodos

Tipo de estudio: experimental

Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL
Independiente Aceite esencial	Producto farmacéutico no artesanal ¹¹ , principalmente obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua al procesar material vegetal fresco, líquido volátil a temperatura ambiente y solubles en alcoholes a alta concentración y poco en agua ⁵ .	Producto farmacéutico no artesanal obtenido de hojas frescas de <i>Shinus molle</i> L. mediante destilación por arrastre con vapor de agua, disuelto con alcohol etílico 96° GL y obteniendo las concentraciones (grupo experimental): 00, 25, 50, 75 y 100%. Su efecto inhibitorio sobre el <i>Streptococcus mutans</i> se basó en los métodos de prueba de sensibilidad a los antimicrobianos: concentración mínima inhibitoria y la susceptibilidad bacteriana, se consideró: - Positivo= Inhibición en ambas métodos o en uno hubo no inhibición. - Negativo= Ambos métodos hubo no inhibición.
Dependiente <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i> es una bacteria coco Gram positivo ¹¹ con 0,5 a 0,75 μ de diámetro y anaerobio facultativo ¹⁶ .	<i>Streptococcus mutans</i> , expresado visiblemente como una colonia convexa o pulviniforme, translúcida, de tamaño puntiforme y mantecosa ante los métodos de prueba de sensibilidad a los antimicrobianos ¹⁷ .

Métodos procedimentales

- Se preparó el inóculo Tioglicolato, según tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland
- Para preparar la muestra a destilar se recolectó y escogió "el molle" durante dos días, tratando de no alterar los componentes de las plantas. Durante dos días como máximo se cortaron las hojas con guillotinas para colocarlas en el molinillo de la licuadora Imaco Modelo BL 75.
- Obtenida la muestra, el procedimiento para obtener aceite esencial es la destilación, utilizando un kilo por 30 minutos desde que hierve el agua, finalmente con cloruro de sodio y una micropipeta se extrajo el aceite esencial. Para obtener las concentraciones, el aceite esencial se mezcló con etanol al 96° GL con una micropipeta, vaciándolo en un Vial.
- Para obtener la CMI se utilizó y vació 0,8 mL de la mezcla de Bencilpenicilina procaínica de un millón UI con agua destilada (grupo control con penicilina) o aceite esencial de cada concentración en tubos de ensayo de 13x100 mL rotulados según concentración o Bencilpenicilina, a los cuales se adicionó 0,2 mL del cultivo de *Streptococcus mutans* diluido. Los tubos fueron colocados en Jarra de Gaspac para incubarlos a 37 °C por 24 horas en microanaerobiosis¹⁷. Se utilizaron 32 repeticiones de Placas Petri con medio Agar Mueller Hinton más 5% de sangre de conejo por concentración, en los cuales se colocó 0.1 mL de cada tubo procesado anteriormente, dispersándolo con un asa de Drigalsky. Se dejó reposar por 10 minutos y luego se colocaron

en Jarra Gaspac para incubarlos a 37 °C por 24 horas en microanaerobiosis, Posteriormente, se contó las UFC, considerando:

- Sensibilidad o inhibición: menor de 30 UFC.
- Resistencia o no inhibición: mayor de 30 UFC.
- Para determinar la susceptibilidad bacteriana, se utilizó el método de difusión con la técnica de Kirby y Bauer mediante 32 discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro por concentración, considerando:
 - Resistencia o no inhibición: diámetro inferior a 8 mm el halo de inhibición.
 - Sensibilidad o inhibición: diámetro de 8 a más mm el halo de inhibición.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como la medicina alopática es cuantiosamente iatrogénica y por la reducida o inexistente accesibilidad económica a los medicamentos de síntesis, aunada a países en vías de desarrollo (Perú) que no tienen una industria farmacéutica completa e internacional, el 80% de la población mundial usa las plantas medicinales¹⁸.

Al aplicar el test de normalidad en la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial, se determinó la utilización de Kruskal-Wallis (tabla 01), luego la prueba de Duncan (tabla 02), resultando diferencia significativa entre el grupo de concentraciones de 25, 50, 75 y 100% y el grupo de la concentración 0% y la bencilpenicilina procaínica. En el primer grupo: 1) existe diversidad de componentes como monoterpenos regulares^{7,8}, sesquiterpenos⁷, lactonas sesquiterpénicas (escasa presencia en aceites esenciales)^{5,7}, cromenos y benzofuranos⁵, alcaloides no oxigenados^{6,7}, benzoquinonas y naftoquinonas^{7,8} que contribuyen en la actividad frente a bacterias patógenas variadas⁷. Las de mayor efecto antiséptico son las moléculas terpénicas que poseen, conforme se mencionan, grupo fenol con función alcohol y función cetona⁶; 2) hay un efecto sinérgico antibacteriano entre las moléculas del aceite y el alcohol porque son solubles mutuamente¹⁹ y en el aceite esencial se encuentran moléculas sólidas cristalinas con enlace intermolecular débil,¹⁹ permitiendo formar derivados terpénicos alcohólicos de comprobado efecto antibacteriano; a pesar de que las concentraciones tienen menos alcohol que la concentración bactericida (60 a 90%)²⁰. Además, los datos obtenidos no son homogéneos porque los del grupo *Streptococcus mutans* en cultivos líquidos tienen crecimiento granular como las concentraciones diluidas preparadas²².

Tabla 01: Prueba de Kruskal-Wallis para número de unidades formadoras de colonias (UFC)

Chi-cuadrado	43.9762
Grados de libertad (gl)	5
Significancia (P)	2.3421E-08

Tabla 02: Prueba de Duncan para la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Grupo de Investigación	N	Grupo para Alfa 0.05	
		Grupo 1	Grupo 2
75%	32	0	
100%	32	0	
50%	32	0.15625	
25%	32	0.46875	
Penicilina (Grupo Control)	32		4.09375
0%	32		5.3125

Al aplicar el test de normalidad en los datos del método de la susceptibilidad bacteriana, se determinó la utilización de la prueba ANOVA (tabla 03); luego la prueba de Duncan (tabla 04), resultando mejor inhibición estadística en la concentración 75% (a pesar que hubo resistencia bacteriana) que en el grupo de concentraciones de 00, 25, 50 y 100%. La razón es que a menor concentración existe menor número de la fracción de Hidrocarburos mono y sesquiterpenos de baja utilidad industrial⁶ que pueden unirse con las moléculas de alcohol¹⁹, ocasionando mayor sinergia en la concentración al 75% al tener mayor número de la fracción de hidrocarburos mono y sesquiterpenos⁶ (los sólidos moleculares tienen un enlace intermolecular débil¹⁹), capaces de formar con el alcohol derivados terpénicos alcohólicos difundibles.

Tabla 03: Análisis de varianza para determinar el efecto del aceite esencial sobre *S. mutans* medida en diámetro del halo de inhibición (mm)

FUENTE DE VARIACIÓN	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Cuadrado medio (CM)	Prueba F	Significancia (P)
Concentraciones	38320.276	5	7664.05521	96850.226	0
Error	14.719	186	0.07913		
Total	38334.99479	191			

Tabla 04: Prueba de Duncan para susceptibilidad (Diámetro del Halo en mm) en el aceite esencial

Grupo de Investigación	N	Grupo para Alfa 0.05		
		G1	G2	G3
0%	32	6		
50%	32	6		
100%	32	6		
25%	32	6.094		
75%	32		6.375	
Penicilina Grupo Control	32			44

Grupos en la misma columna no difieren estadísticamente.

El efecto inhibitorio de las concentraciones del aceite esencial de *Shinus molle* L. "molle" sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es positivo (cuadro 01), porque cada método demostró reacciones químicas y propiedades físicas diferentes que explican los resultados. Con el método de la CMI, por ejemplo, hubo inhibición: 1) en las concentraciones porque los compuestos antibacteria-

nos tuvieron contacto directo con el *Streptococcus mutans*; 2) en las concentraciones 25, 50 y 75% porque hay un efecto sinérgico antibacteriano entre las moléculas del aceite y alcohol al ser solubles mutuamente¹⁹ y tener moléculas sólidas cristalinas con enlace intermolecular débil¹⁹ que permiten formar derivados terpénicos alcohólicos de comprobado efecto antibacteriano; a pesar que las concentraciones tienen menos alcohol que la concentración bactericida (60 a 90%)²⁰; 3) porque la cantidad de aceite esencial en las concentraciones 25, 50, 75 y 100% presenta diversidad de componentes, que contribuyen en la actividad frente a bacterias patógenas variadas⁷, siendo las de mayor efecto antiséptico las moléculas que poseen, conforme se mencionan, grupo fenol con función alcohol y función cetona⁶; 4) en la concentración al 00% porque la concentración del alcohol está dentro de la concentración bactericida (60 a 90%)²⁰. Además, con el método de la susceptibilidad bacteriana no hubo inhibición (cuadro 01) porque 1) a temperatura ambiente el aceite esencial del *Shinus molle* L. es un líquido viscoso⁹ y volátil^{6,7}, y el alcohol es un líquido volátil, al mezclar las concentraciones usadas siguen siendo volátiles y viscosas, y al incubarlas a 37 °C la velocidad de volatilización aumenta debido al incremento de la temperatura¹⁹, ocasionando que sus moléculas antibacterianas al estar difundiéndose no tengan el tiempo suficiente para ser efectivas por el aumento de la temperatura. Entre las moléculas volátiles tenemos los cromenos y benzofuranos⁵, algunos derivados terpénicos⁶ y alcaloides no oxigenados líquidos a temperatura ambiente^{6,7}, benzoquinonas y naftoquinonas^{7,8} y el alcohol. 2) El papel de filtro no actúa únicamente como soporte para el disolvente, sino como agente de separación por adsorción, puesto que retiene a unas sustancias más que a otras; sumado a que los procesos de adsorción-desorción y solubilidad diferencial tienen lugar de modo continuo mientras la mezcla se desplaza a través del papel²¹. 3) Las sustancias se retienen porque los sólidos moleculares tienen un enlace intermolecular débil¹⁹, como las lactonas sesquiterpénicas.

CUADRO 01: Determina el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. "molle" sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

ACEITE ESENCIAL	MÉTODO		EFECTO INHIBITORIO
	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	SUSCEPTIBILIDAD	
0% (alcohol etílico 96° GL)	Inhibición	No inhibición	Positivo
25%	Inhibición	No inhibición	Positivo
50%	Inhibición	No inhibición	Positivo
75%	Inhibición	No inhibición	Positivo
100%	Inhibición	No inhibición	Positivo
Control: PEN	Inhibición	No inhibición	Positivo

Fuente: Obtenido por el autor mediante examen microbiológico e inferido mediante pruebas estadísticas.

Finalmente, el siguiente estudio deberá dedicarse a investigar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos, aceite esencial y extracto etanólico del *Shinus molle* L. "molle" sobre el *Streptococcus mutans* ATCC para determinar qué extracto tiene mejor efecto inhibitorio y continuar estudios fitoquímicos y clínicos con el extracto.

IV. CONCLUSIONES

1. La menor concentración inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. "molle" sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es 25% al aplicar el método concentración mínima inhibitoria.
2. La susceptibilidad *in vitro* del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en aceite esencial de *Shinus molle* L. "molle" es resistencia, al aplicar la técnica de Kirby y Bauer.
3. El aceite esencial de las hojas del *Shinus molle* L. tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 25, 50, 75 y 100%.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cabieses F. *Apuntes de medicina tradicional: La racionalización de lo irracional*. Perú: Lima (Perú): Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC); 1993.
2. Mejía Díaz L, Rutiaga Quiñones J. *Composición química de la madera de Schinus molle L. y obtención de pulpa celulósica*. [Tesis para Título]. México: Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2007.
3. Ayala Terán A. *Establecimiento de cultivo in vitro de Molle (Schinus molle L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el distrito Metropolitano de Quito*. [Tesis para Título]. Quito-Sangolqui: Departamento de las Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército; 2011.
4. González A. *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las Amazonas*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales Departamento de Ingeniería Química; 2004.
5. Lock de Ugaz O. *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. 2 Ed. Lima (Perú): Fondo Editorial PUCP; 1994.
6. Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona (España): Omega S. A.; 2000.
7. Villar del Fresno A. *Farmacognosia General*. España (Madrid): Síntesis, S.A., 1999.
8. Bruneton J. *Farmacognosia: fitoquímica-plantas medicinales*. 2da ed. España: ACRIBIA, S.A.; 1997.
9. Zegarra G. *Actividad deterrente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y Tarwi* [Tesis para Título]. Lima: Facultad de Ciencias e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú; 2010.
10. Sociedad Española de Fitoterapia. Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia – Libro de resúmenes. Rev de Fitoterapia 2006 Dic; 6 (Sup1).
11. Liébana J. *Microbiología Oral*. 2da ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España S.A. U.; 2002.
12. Muñante Cárdenas J. *Identificación de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos frecuentes en necrosis pulpares*. [Tesis para título]. Lima: Facultad de Estomatología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
13. Dinatale EP. *Diseminación de la infección odontogénica: Revisión de la literatura*. Acta Odont. Venez. 2000 Ene [citado 22 Abril 2012]; 38 (1): 37-43.
14. Pardi G, Cardozo ED. *Relación entre la placa dental y la estomatitis sub-protésica*. Acta Odont Venez 2003 Ene [citado 22 Abril 2012]; 41 (1): 72-76.
15. Olimpio K, Bastos J, Henríquez J, Cardoso V, Silva P, Bardal P, Ramírez I. *Caries y enfermedad periodontal causadas por tratamiento ortodóntico en ausencia de un programa educativo-preventivo*. Rev Odont Dominicana 2003; 9: 31-37.
16. Neira A, Ramírez M y Sánchez N. *Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de Psidium guineense Sw (Choba) frente a Streptococcus mutans, agente causal de caries dentales*. Rev Cub Plant Med 2005 Dic; 10 (3-4).
17. Koneman E., Winn W., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., et. al. *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas en color*. 6a ed. Madrid: Med. Panamericana; 2006.
18. Fernández F. *Medicina natural: Conocimiento milenario*. Trujillo (Perú): Museo de Arqueología, Antropología e Historia de la Facultad de Ciencias Sociales, Universidad Nacional de Trujillo; Serie Antropología 1 N° 1; 2009.

19. Instituto de Ciencias y Humanidades. *Química, análisis de principios y aplicaciones*. 3a ed. Lima (Perú): Asoc. Fondo de Investigadores y Editores; 2008.
20. Rotger R. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid: España. Edit. Síntesis, S. A. 1997.
21. The Nuffield Foundation by Longman/Penguin Books. *Ciencia combinada guía del profesor* Volumen 3. Barcelona (España): Reverté, S. A; 1974.