UNIVERSIDAD REGIONAL AUTÓNOMA DE LOS ANDES

UNIANDES

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA

TEMA:

EFECTO IN VITRO ANTIMICROBIANO DE *COMMIPHORA MYRRHA* MIRRA FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS*

AUTORA: BQF. ELIZALDE GONZÁLEZ VALERIA

ASESORES: DR. VITERI RODRIGUEZ JUAN ALBERTO

ING. OÑA CISNEROS FABIAN DAVID

AMBATO - ECUADOR

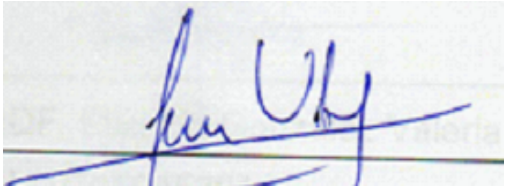
2018

APROBACIÓN DE LOS ASESORES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICACIÓN:

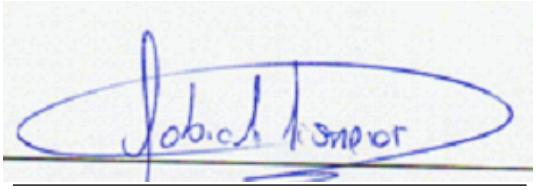
Quienes suscriben, legalmente **CERTIFICAN QUE:** El presente Trabajo de Titulación realizado por la **BQF. Elizalde González Valeria**, Maestrante del Programa de Maestría en Farmacia Clínica y Hospitalaria, Facultad de Ciencias Médicas, con el tema "**EFECTO IN VITRO ANTIMICROBIANO DE *COMMIPHORA MYRRHA* MIRRA FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS*"**, ha sido prolijamente revisado, y cumple con todos los requisitos establecidos en la normativa pertinente de la Universidad Regional Autónoma de los Andes -UNIANDES-, por lo que apruebe su presentación.

Ambato, Mayo del 2018



Dr. VITERI RODRIGUEZ JUAN ALBERTO

Asesor



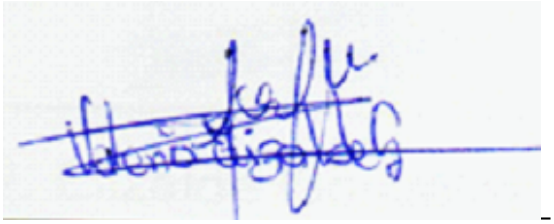
Ing. OÑA CISNEROS FABIAN DAVID

Asesor

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, **Elizalde González Valeria**, maestrante del Programa de Maestría de Farmacia Clínica y Hospitalaria, Facultad de Ciencias Médicas, declaro que todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, previo a la obtención del Grado Académico de **MAGÍSTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA**, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas, por lo que son de mi exclusiva responsabilidad.

Ambato, Mayo 2018



BQF. Elizalde González Valeria

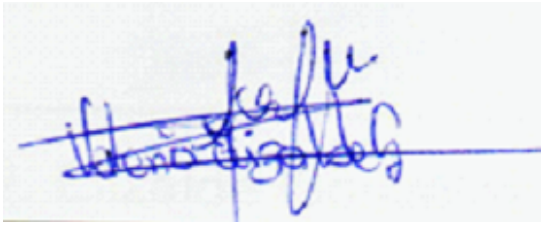
CI.: 0705045201

Autora

DERECHOS DE LA AUTORA

Yo, **Elizalde González Valeria**, declaro que conozco y acepto la disposición constante en el literal d) del Art. 85 del Estatuto de la Universidad Regional Autónoma de los Andes, que en su parte pertinente dice: El patrimonio de la UNIANDES está constituido por "La propiedad intelectual sobre las Investigaciones, trabajos científicos o técnicos, proyectos profesionales y consultoría que se realicen en la Universidad o por cuenta de ella"

Ambato, Mayo 2018



BQF. Elizalde González Valeria

CI.: 0705045201

Autora

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de investigación:

En primer lugar a Dios por permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis padres, por los consejos, los valores inculcados, por el apoyo a lo largo de mi vida para cumplir con cada meta propuesta.

A mi esposo, por el amor, comprensión, apoyo incondicional al enfrentar cada adversidad para llegar al final de esta importante etapa de mi vida.

Valeria Elizalde González

AGRADECIMIENTO

En cada etapa de mi vida debo agradecer siempre a Dios por su amor infinito y su guía a lo largo de todo este camino.

También agradezco a cada una de las personas que estuvieron a mi lado mis padres, mi esposo, mis hermanos, amigos ya que de una u otra manera recibí su apoyo en esta etapa estudiantil para llegar con éxito al final de mi meta.

Además agradezco a la Universidad Regional Autónoma de los Andes en especial al programa de Maestría en Farmacia Clínica y Hospitalaria por la oportunidad de realizar en sus aulas mis estudios de cuarto nivel. A mis asesores del proyecto de investigación por toda su colaboración, paciencia y buena voluntad, quienes con sus conocimientos y experiencia, hicieron posible la realización de mi trabajo de investigación.

Valeria Elizalde González

ÍNDICE GENERAL

PORTADA

APROBACIÓN DE LOS ASESORES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

DERECHOS DE LA AUTORA

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE GRAFICOS

RESUMEN

ABSTRACT

Introducción.....1

Antecedentes de la investigación.....1

Planteamiento del problema.....3

Formulación del problema.....4

Delimitación del problema.....4

Objeto de investigación.....5

Campo de acción.....5

Línea de investigación.....5

Objetivo general.....5

Objetivos específicos.....6

Hipótesis.....6

Justificación del tema 6

Metodología 7

Resumen de la estructura de la tesis 8

Aporte teórico 8

Significación práctica 8

Novedad científica 8

CAPITULO I. 9

MARCO TEÓRICO 9

1. Mirra (Commiphora myrrha) 9

1.1 Generalidades 9

1.1.1. Taxonomía y morfología 13

1.1.2. Composición química del aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha* 13

1.1.2.1 Composición química del aceite esencial 13

1.1.2.2. Composición química del aceite esencial y extracto etanólico 15

1.1.3. Usos medicinales 15

1.2. Métodos de extracción en fitoquímica 16

1.2.1. Extracción sólido-líquido 17

1.2.2. Maceración 17

1.2.3.- Percolación o lixiviación 17

1.2.4. Extracción líquido-líquido 18

1.3 Enfermedades Dentales y Bucales 18

1.3.1 Placa Bacteriana 18

1.3.2 Caries 19

1.3.3 Microorganismo 21

1.3.3.1 Bacterias Gram positivas y Gram negativas.- definición y características.- estructura 21

1.3.3.2 *Streptococcus Mutans* 25

1.3.3.2.1 Morfología 28

1.3.3.2.2 Metabolismo 28

1.3.3.2.3 Reproducción 29

1.3.3.2.4 Clasificación 29

1.4 Conclusiones del capítulo 31

CAPITULO II 32

MARCO METODOLÓGICO Y PLANTEAMIENTO DE LA PROPIUESTA 32

2. Caracterización del sector 32

2.1 Descripción de procedimiento metodológico 32

2.1.1 ETAPA 1: Estudio Etnofarmacológico 32

2.1.1.1. Universo y muestra 33

2.1.2 ETAPA 2: Obtención de aceite esencial y extracto etanólico 35

2.1.3 ETAPA 3: Estudio Microbiológico 37

2.2. Conclusiones parciales 40

CAPITULO III 41

MARCO PROPOSITIVO 41

3.- ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN 41

3.1.- ESTUDIO ETNOFARMACOLÓGICO DE PLANTAS MEDICINALES.- 41

3.2 Estudio microbiológico 52

3.3.- Análisis estadístico ANOVA 58

3.4 Conclusiones parciales 63

CONCLUSIONES GENERALES 64

RECOMENDACIONES 65

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química del aceite esencial Commiphora myrrha 14
Tabla 2 Composición química extracto hidroalcohólico Commiphora myrrha 15
Tabla 3 Universo y muestra 33
Tabla 4 Personas que conocen plantas medicinales 42
Tabla 5 Plantas utilizadas con fines medicinales 43
Tabla 6 Nivel de uso significativo de las plantas utilizadas con fines medicinales del estudio etnofarmacológico.....45
Tabla 7 Utilización de la planta 46
Tabla 8 Índice del nivel de uso de las plantas medicinales utilizadas 47
Tabla 9 Estudio Etnofarmacológico Plantas Medicinales.- Guayaquil, Sector Sauces 1, 2 Y 7.....48
Tabla 10 Promedios de halos de inhibición del aceite esencial de Commiphora myrrha frente a S. mutans.....53
Tabla 11 Frecuencia del promedio de Halos de inhibición del aceite esencial de Commiphora myrrha 55
Tabla 12 Promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de Commiphora myrrha frente a S. mutans.....56
Tabla 13 Frecuencia del promedio de Halos de inhibición del Extracto Etanólico de Commiphora myrrha frente a S. mutans 57
Tabla 14 Análisis de varianza del aceite esencial (Halo inhibición (mm)): 58
Tabla 15 Coeficientes estandarizados del aceite esencial (Halo inhibición (mm)): 58
Tabla 16 Medias LS para el factor dilución del aceite esencial 59
Tabla 17 Análisis de varianza del extracto etanólico (Halo inhibición (mm)).....60
Tabla 18 Coeficientes estandarizados de extracto etanólico (Halo inhibición (mm)) 61
Tabla 19 Medias LS para el factor dilución de extracto etanólico 62

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1 Personas que conocen plantas medicinales.....42
Gráfico 2 Plantas utilizadas con fines medicinales en el sector Sauce, etapas 1,2 y 7 Guayaquil. 43
Gráfico 3 Promedio de Diámetro de Halos de Inhibición para el Aceite Esencial al 25%, 50%, 75% y 100% de Commiphora myrrha frente a S mutans 55
Gráfico 4 Promedio de Diámetro de Halos de Inhibición para el extracto etanólico al 25%, 50%, 75% y 100% de Commiphora myrrha frente a S. mutans 57
Gráfico 5 Coeficientes estandarizados del aceite esencial (Halo inhibición (mm))59
Gráfico 6 Coeficientes estandarizados de extracto etanólico (Halo inhibición (mm)) 61
Gráfico 7 Medias LS para el factor dilución de extracto etanólico.....62

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos años ha impulsado el uso de la medicina tradicional como una alternativa en la salud primaria y sobre todo en áreas rurales donde se dificulta el acceso a la atención médica oportuna.

Esta investigación plantea tres fases:

Estudio etnofarmacológico realizado en la ciudad de Guayaquil, donde se obtuvo un 20% de nivel de uso significativo para *Commiphora myrrha* (mirra) con índice de valor de uso 0,022.

Los metabolitos secundarios presentes en la mirra son Furanoeudesma-1,3-diene, Curzerene, β-elemene, 2-O-acetyl-8,12epoxigermacrama1-1(10)-4,7,11-tetraene, además de polisacáridos, aminoácidos y flavonas.

La actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial y extracto etanólico *Commiphora myrrha* fue investigada sobre *Streptococcus mutans*, utilizando como control blanco agua destilada y control positivo clorhexidina al 2%. Los valores promedios más altos de halo inhibitorio fueron en la concentración al 100%, presentando 12mm y 10mm para el aceite esencial y extracto etanólico respectivamente; acorte a la escala de Duraffourd se encuentran en sensibilidad límite. Los resultados obtenidos fueron evaluados por medio de la prueba ANOVA (Análisis de varianza) donde el valor de P es $< 0,001$ rechazando la no existencia de actividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto etanólico.

Palabras claves: *Commiphora myrrha*, *Streptococcus mutans*, aceite esencial, halos de inhibición.

ABSTRACT

Myrrh is a plant that uses bark and resin for dermatological purposes, however, the ethnopharmacological study showed that in Ecuador 21% of the population knows these properties of the plant. The phytochemical study indicates that the most abundant compounds in the essential oil of Commiphora myrrha are Furanoeudesma-1,3-diene (34.45%), this one of known antimicrobial and antifungic activity, Curzerene (8.5-40.1%), β-elemene (8.4%) and 2-O-acetyl-8,12epoxygermacrama1-1 (10) -4,7,11-tetraene (6.5%). The in vitro antimicrobial activity of the essential oil and the ethanol extract of myrrh (Commiphora Myrrha) was investigated on the Streptococcus Mutans, using as a target distilled water and 2% chlorhexidine positive control. The results obtained when treating the microorganism with essential oil of Commiphora myrrha were halos of inhibition of 6 mm for the one of 25%; 7 mm at 50%, and 9 mm at 75%, with 60% inhibitory percentage the latter. In the case of the ethanolic extract of Commiphora myrrha, inhibition halos of 6 mm were presented in a concentration of 25%, 7 mm for 50%, and 8 mm for 75%, the latter with 53.33% inhibitory percentage. The antimicrobial effect of the essential oils and ethanolic extracts of myrrh is evidenced by the results presented above.

Key words: *Commiphora Myrrha, Streptococcus mutans*, essential oil, ethanolic extract, inhibition halos.

Introducción

Antecedentes de la investigación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) plantea estrategias sobre medicina tradicional. Producto del trabajo de Asesores regionales en materia de las seis regiones de la OMS y las pertinentes unidades o departamentos técnicos de la Organización. La medicina tradicional es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no; utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales. Los términos “medicina complementaria” o “medicina alternativa” indican un amplio conjunto de prácticas de atención de salud que no forman parte de la tradición ni de la medicina convencional de un país y tampoco están totalmente integradas en el sistema de salud predominante. En algunos se utiliza el término de medicina tradicional y complementaria fusionando dos términos que abarcan productos, prácticas y profesionales [(1)].

Las raíces de la medicina tradicional pertenecen a un pasado de más de 10 mil años, dicha permanencia ha sido sostenida por los pueblos de más bajos recursos: indios, mestizos, montubios y campesinos, quienes han encontrado en la medicina tradicional una alternativa menos costosa y más coherente con su cosmovisión, pero que necesita ser sistematizada y completar estudios fitoquímicos para el desarrollo de fitofármacos [(15)].

Se estima que en la tierra existen unas 265.000 plantas superiores, de las cuales menos del 1% ha sido estudiado exhaustivamente en sus componentes químicos y acción farmacológica [(14)].

Desde hace siglos, las comunidades y pueblos ancestrales encontraron en la tierra sus "farmacias" naturales. En el Ecuador cada vez son más las personas que cosechan sus propios ejemplares para tratar enfermedades, actualmente están registradas 3.118 plantas que pertenecen a 206 familias con fines medicinales. Según estudios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) el 45% se registra en la categoría de síntomas, mientras que el 26% se encarga de las afecciones causadas por bacterias, virus, hongos o protozoos, y

el porcentaje restante de plantas se distribuyen para tratar heridas, lesiones y desórdenes del sistema digestivo. Los kichwas de la amazonía usan muchas especies de plantas con destino medicinal, seguidos de los kichwas de la Sierra y de los mestizos [2].

Los medicamentos elaborados a partir de plantas se basan en sus metabolitos secundarios que tiene varios efectos farmacológicos y pueden promover la salud y aliviar enfermedades. Existen compuestos como terpenos, alcaloides, flavonoides, cumarinas y otros metabolitos en plantas medicinales. Diversas plantas de origen tropical y subtropical han sido investigadas en todo el mundo debido a sus potentes actividades antioxidantes y antimicrobianas [9].

La *Commiphora myrrha* es una planta ancestral, *e*n Egipto, 2500 años AC, se empleaba para el tratamiento de las heridas [3]. En Grecia, 400 AC, Hipócrates describió las propiedades terapéuticas de la mirra, tanto depurativas como antisépticas. [4] En Roma, Celsus usó mirra y barbarum (contienen cobre y plomo) para el tratamiento de varios procesos infecciosos [5].

Una combinación de aceite esencial de mirra y el aceite esencial de incienso puede ayudar a combatir infecciones actuando como un antimicrobiano [6]. El aceite esencial de mirra puede ayudar a reducir la inflamación en las células de las encías [7].

Estudios *in vitro* han demostrado que los extractos hidroalcohólicos de *Matricharia camomila* y *Commiphora myrrha* tienen efectos comparables a la clorhexidina sobre microorganimos anaerobios [8].

Un estudio denominado “Composición química del aceite esencial y antioxidante in vitro y actividades antimicrobianas de extractos crudos de resina *Commiphora myrrha* da a conocer que, esta resina podría ser usada como fuente natural de compuestos antioxidantes y antimicrobianos para posibles aplicaciones en industrias alimentarias y nutracéuticas [9].

La importancia en el área médica y odontológica de productos naturales se hace fundamental hoy en día, por ello la elaboración de ensayos microbiológicos que comprueba la actividad antimicrobiana de extractos

naturales, para la inhibición de *Streptococcus mutans* contribuyen como una medida coadyuvante a la prevención de futuras enfermedades como caries y enfermedades periodontales. [12] [13]

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, en la presente investigación se realizaran los siguientes objetivos: (i) extraer el aceite esencial de la mirra por destilación por arrastre de vapor y preparar su extracto etanólico (ii) evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mirra *Commiphora myrrha* en *Streptococcus mutans* y (iii) evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto etanólico de la mirra en *Streptococcus mutans*.

Planteamiento del problema

Relativamente son pocos los países que han desarrollado una política sobre Medicina Tradicional, sólo 25 de los 191 estados miembro de la OMS. Aun así, dicha política propone una base sólida para definir el papel de la Medicina Tradicional en el aporte sanitario nacional, certificando que se creen los mecanismos normativos y legales necesarios para promover y mantener una buena práctica, que el acceso sea equitativo, y se afirme la autenticidad, la seguridad y la eficacia de las terapias. También puede ayudar a asegurar una provisión suficiente de recursos económicos temas de investigación, educación y formación [10].

La resistencia a los antimicrobianos amenaza actualmente nuestra capacidad de tratar con eficacia las infecciones. Por ello, el desarrollo de fitofármacos utilizando las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales se convierte en una alternativa viable para superar la situación [16].

Estudios demuestran que *Streptococcus mutans* es un factor etiológico primario de la caries dental, una enfermedad creciente generalmente en niños. Microorganismo de características novedosas que determinan la patogenicidad de esta enfermedad, puede contribuir a la comprensión de los mecanismos de las infecciones bacterianas [11].

Otros estudios ratifican que *Streptococcus mutans* es un potencial patogénico de las bacterias cariogénicas y está relacionado con la capacidad de metabolizar un amplia gama de azúcares, para formar biofilm y crear un medio ácido. Uno de los intermediarios clave en el metabolismo de *Streptococcus mutans* es el piruvato. El pH se mantiene a través de este compuesto conectado a la síntesis de aminoácidos. Estudios demuestran que la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (valinas, leucinas, isoleucinas) es uno de los componentes de la adaptación a un ambiente ácido [(11)].

Se atribuye un efecto antibacterial al extracto de *Commiphora myrrha* como un mecanismo de anti-adherencia que involucra la unión de bacteria a la superficie dental [(18)].

Por su potencial antibacterial el extracto de *Commiphora myrrha* podría ser utilizado para crear nuevos productos farmacéuticos e industriales [(16).]

Formulación del problema

¿Cuál es el efecto antimicrobiano del aceite esencial y el extracto etanólico de la *Commiphora myrrha* sobre *Streptococcus mutans*?

Delimitación del problema

La presente investigación se llevará a cabo en la ciudad de Guayaquil, Ecuador en el sector Sauces etapa1, 2 y 7 donde existe una población de 76.540 según el Centro de estudios e Investigaciones Estadísticas ICM-ESPOL [(17)].

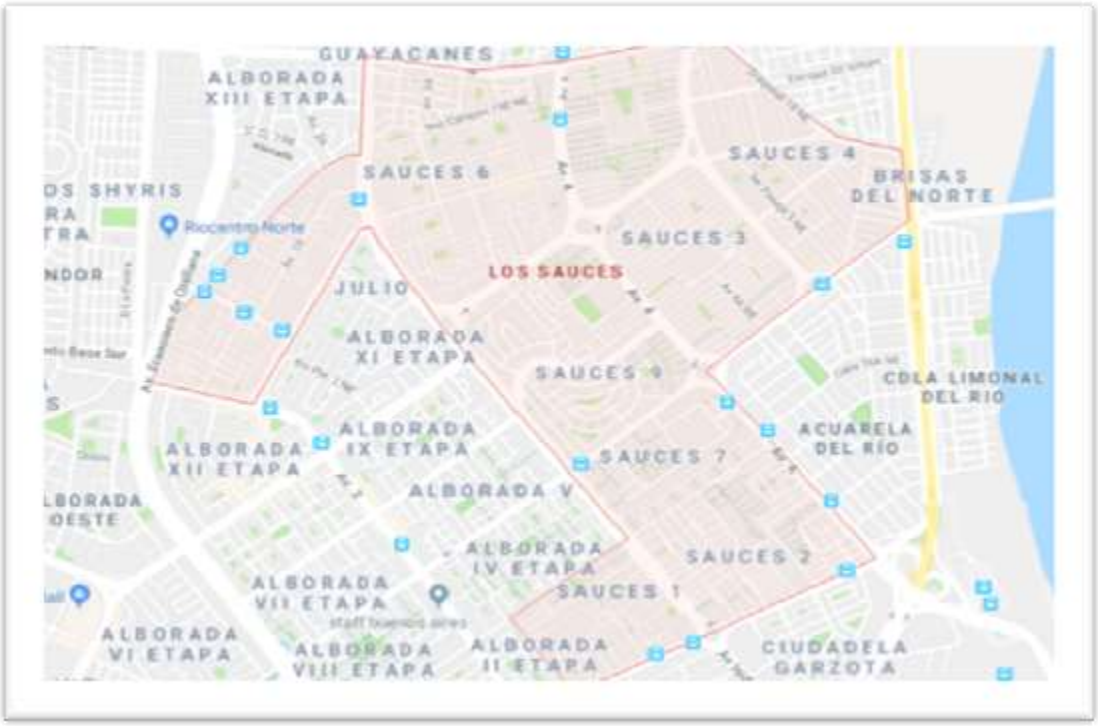


Figura 1 Sauces, Guayaquil, Ecuador

Objeto de investigación

Efecto antimicrobiano del aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha* frente a *Streptococcus mutans.*

Campo de acción

Estudio etnofarmacológico, obtención aceite esencial y extracto etanólico de la mirra *Commiphora myrrha* y análisis microbiológico de la mirra frente a *Streptococcus mutans.*

Línea de investigación

Estudios microbiológicos

Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha* sobre *Streptococcus mutans.*

Objetivos específicos

Realizar un estudio etnofarmacológico y determinar el índice del valor de uso y el nivel de uso significativo de las plantas medicinales.
Extraer el aceite esencial de la resina de mirra a través de destilación de arrastre de vapor de agua y su extracto etanólico a través del método de maceración.
Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto etanólico de la mirra Commiphora myrrha en Streptococcus mutans.

Hipótesis

Hipótesis alterna

El aceite esencial y extracto etanólico de mirra (*Commiphora myrrha)* presenta efecto antimicrobiano frente a la cepa de *Streptococcus mutans.*

$$\mathbf{Hi: \mu \neq 0}$$

Hipótesis nula

El aceite esencial y extracto etanólico de mirra (*Commiphora myrrha)* no presenta efecto antimicrobiano frente a la cepa de *Streptococcus mutans.*

$$\mathbf{Ho: \mu = 0}$$

Justificación del tema

Paracelso, el padre de la Farmacología Química, médico y químico suizo en pleno Renacimiento, fue el primero en señalar que las propiedades medicinales de las plantas radican en sus principios activos aislables por técnicas alquímicas.[19]

Las propiedades biológicas de los extractos, fracciones, compuestos puros y aceites esenciales, incluyeron, según el caso: la actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, fotoprotectora, hipoglucemiante y antiinflamatoria. Los resultados obtenidos al evaluar las diferentes propiedades biológicas de las

plantas indican una estrecha relación entre la fitoquímica, la farmacognosia y el uso de la planta en la medicina tradicional de las especies utilizadas en esta región del país. [20]

Las plantas utilizadas tradicionalmente con uso medicinal constituyen uno de los capítulos más importantes de la medicina alternativa y complementaria (MAC) y un recurso para encontrar fármacos ante nuevas afecciones microbiológicas producidas por la resistencia adquirida de los microorganismos y por el aumento de personas inmunodeprimidas.[21] [22]

En las últimas dos décadas, la industria farmacéutica internacional ha abierto una novedosa línea de productos, basada en extractos estandarizados de especies vegetales (el contenido de principio activo del extracto ha sido analizado y cuantificado). [23]

Es importante, que con el surgimiento de éstos fármacos, se puede conocer el valor farmacológico de las plantas, para poderlas aplicar en el campo de la salud pública. Por consiguiente, la seguridad y la eficacia de los fitofármacos, debe sustentarse en la investigación científica, y la demostración de la actividad farmacológica y clínica, así como en la determinación de la posible toxicidad. [24]

El estudio de la granada tiene efectos antibacteriales contra microorganismos presentes en la placa dental, lo que abre camino para desarrollar estudios tendientes al tratamiento de las caries y otras afecciones bucales con otras plantas de características medicinales**.** [25]

Así como el estudio de la granada el presente estudio de *Commiphora mirrha* sobre la cepa de *Streptococcus mutans* permitirá abrir camino para posteriores estudios sobre elaboración de fitofármacos con acción antimicrobiana para uso bucal.

Metodología

El presente proyecto de investigación se llevará a cabo en tres fases: Estudio etnofarmacológico donde se aplicará la encuesta como herramienta para determinar el nivel de uso significativo e índice de valor de uso de las plantas medicinales, en la segunda fase se realizará la obtención de aceite esencial

mediante el método de destilación por arrastre con vapor de agua y obtención de extracto etanólico mediante el método de maceración, en la tercera fase se realizará un estudio microbiológico mediante el método de difusión de discos con el fin de establecer el efecto inhibitorio del aceite esencial y extracto etanólico frente una cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Resumen de la estructura de la tesis

El presente trabajo de investigación está establecido por tres capítulos que contienen información bibliográfica que sustentará la discusión y fundamentará su contenido, la metodología donde se explicará los mecanismos que se utilizarán para la obtención de los resultados y finalmente el análisis de los resultados obtenidos.

Aporte teórico

El aporte teórico del presente trabajo de investigación es contribuir con recopilación de información bibliográfica a través del estudio etnofarmacológico y resultados del estudio microbiológico de *Commiphora mirra* sobre *Streptococcus mutans* información que servirá como fuente bibliográfica para futuras investigaciones sobre plantas medicinales.

Significación práctica

El presente trabajo servirá de apoyo para posteriores investigaciones en las que se estudie la elaboración de fitofármacos a partir de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora mirra.*

Además permite conocer otros beneficios de esta especie vegetal y ser aprovechados por la población que aún no tiene conocimiento de ellos y darle un uso más significativo.

Novedad científica

La presencia de metabolitos secundarios en el aceite esencial de la resina de la *Commiphora myrrha* permitirá establecer la capacidad de éstos de inhibir el crecimiento de *Streptococos mutans***.**

CAPITULO I.

MARCO TEÓRICO

1. Mirra (Commiphora myrrha)

1.1 Generalidades

Commiphora myrrha es una especie de la familia Burseráceae, natural de Somalia y otras regiones de África. De su resina se obtiene la mirra [23].

Esta resina es una de las medicinas más antiguas que se ha registrado siendo ampliamente usada en el antiguo Egipto [24].

Famosa por ser uno de los regalos entregados por los tres hombres sabios a un Jesús de Nazareth recién nacido, es frecuentemente usada en el herbalismo moderno. No es usualmente cultivada, la mayoría se recolecta silvestre [25].

Esta hierba está contraindicada durante el embarazo debido a su actividad emenagoga. Es aconsejable diluir mirra antes de su uso y administrar dosis moderadas. Se han observado reacciones alérgicas [26].

Se presenta como matorrales en el desierto, en suelos poco profundos, principalmente sobre piedra caliza a elevaciones de 250 a 1.300 metros [25].

Es una planta de los trópicos y subtrópicos más secos. Las plantas prefieren una temperatura mínima que no caiga por debajo de aproximadamente 10 °C. Crece silvestre en áreas donde la precipitación media anual está dentro del rango de 230 - 300 mm. Requiere un suelo bien drenado y una posición a pleno sol [25].

Se obtiene una oleoresina gomosa, fragante, similar a un bálsamo, a partir de heridas en la corteza de los tallos. Se utiliza para aromatizar bebidas, productos horneados, dulces, postres, chicles, etc [27].

Como uso agroforestal es una especie importante que protege el suelo en áreas propensas a la erosión eólica [24].

La mirra es un ingrediente común del polvo de dientes, y se usa con bórax en tintura, con otros ingredientes, como un enjuague bucal [25].

La *Commiphora myrrha* es la especie más importante de mirra que se ha utilizado como un agente antimicrobiano eficaz, es una de las hierbas medicinales más efectivas en el mundo para el dolor de garganta, las aftas y la gingivitis. Es útil para el tratamiento de acné, forúnculos y artritis. La mirra tiene acción estimulante local y antiséptica para heridas y abrasiones. Se usa como enjuague bucal y como un estimulante uterino y emenagogo [28].

Se usa en el tratamiento de infecciones en la boca como úlceras bucales, piorrea así como problemas catarrales de faringitis y sinusitis. Es excelente en la boca dolorida y ulceración extrema [28].

El extracto de mirra (goma) efectivamente disminuye el incremento de glucosa en sangre por encima de la concentración en ayunas para la prueba de tolerancia oral a la glucosa en ratas tanto normales como diabéticas y puede llegar a ser un agente terapéutico útil en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente. Se usa también en cosmética para preparaciones para el tratamiento del cabello y el cuero cabelludo. La tintura de mirra se usa para la terapia de úlceras aftosas (Estomatitis aftosa). La Mirra reduce el colesterol y triglicéridos y pueden terminar con el embarazo [28].

Exhibe una fuerte actividad antitrombótica. El extracto de mirra se usa como medicamento de ayuda digestiva, y es aprobado por la FDA para el uso en alimentos y productos farmacéuticos de salud oral [28].

La mirra se usa en la medicina tradicional china para aliviar dolor e hinchazón debido a una lesión traumática. Esta usado como agente hipolipidérmico. Mirra es útil en gastritis crónicas y dispepsia, así como en frecuentes ronchas mucosas acompañadas por flatulencia. Ayuda en el tratamiento de la laringitis y quejas respiratorias [28].

El extracto de mirra de éter de petróleo de *Commiphora* produjo inhibición significativa de inflamación inducida por carragenina y granuloma de pellets de algodón. También mostró actividad antipirética significativa en ratones [28].

Recientemente, la actividad citotóxica y antitumoral de la mirra ha demostrado ser equivalente a la del citotóxico estándar ciclofosfamida, en carcinoma de células tumorales en ratones. El tratamiento con *Commiphora myrrha* no mostró mutagenicidad [28].

El tratamiento con el aceite esencial de mirra mejoró significativamente el eczema atópico infantil. Esto puede deberse a una fuerte dermatitis de contacto alérgica posiblemente provocada por los propios aceites esenciales. Las fracciones de sesquiterpeno de *Commiphora*, mostraron actividad antibacteriana y antifúngica frente a cepas patógenas estándar de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*, con concentraciones inhibitorias mínimas que van desde 0,18 hasta 2,80 mg/ml. Estos compuestos también tienen actividad anestésica local bloqueando la corriente de sodio hacia el interior de las membranas de los mamíferos excitables. El extracto botánico de mirra podría usarse solo o en combinación con dosis subletales de ciertos insecticidas para controlar el gusano de la hoja del algodón. El examen histológico de larvas de mosquito tratadas con mirra mostró efectos patológicos significativos sobre su grasa, músculos, intestino y tejidos nerviosos. Recientemente, un extracto purificado de mirra de alcohol metílico se ha formulado como cápsulas de gelatina blanda, supositorios y emulsión conocidos comercialmente como Mirazid, que se considera un nuevo fármaco seguro con efectos potenciales contra Schistosoma mansoni y Schistosoma haematopium [28].

Además, es un potente fármaco fasciolicidal con una tasa de éxito del 94,1%. Se estudió la evaluación de la actividad moluscicida de la mirra en caracoles de Biommphalaria alexandrina, y se demostró que la actividad se debe al extracto del aceite en lugar de a la resina oleosa. El fraccionamiento del extracto de aceite condujo al aislamiento de un componente bioactivo con actividad molusquicida contra los caracoles durante periodos de exposición de 24 y 48 h, respectivamente. El extracto de éter de petróleo de mirra de disminuyó el colesterol sérico, fosfolípidos, triglicéridos y lípidos en pollos hipercolesterolémicos experimentales, mientras que el extracto de acetato de etilo tuvo menor actividad anticolesterolémica en ratas, y fue eficaz como

agente hipolipidémico en perros y monos. También se usó en el tratamiento de la artritis reumatoide y la obesidad. El esteroide aislado de *Commiphora* mostró actividad antiinflamatoria. Mostró una marcada inhibición de ADP, adrenalina y agregación plaquetaria inducida por serotonina. También mostró una fuerte acción estimulante de la tiroides cuando se administra a ratas albinas [(28)].

Se usa como expectorante, antiespasmódico, estimulante uterino y emenagogo. Se utiliza con éxito en la bronquitis crónica, el asma bronquial y la tuberculosis pulmonar, y también en la amenorrea y la menorragia para regular la menstruación. El extracto de acetato de etilo de la mirra, en ratas albinas, impidió significativamente un aumento del colesterol sérico y los niveles séricos de triglicéridos causados por la dieta aterogénica. Se encontró que el aceite esencial era fungistático o fungicida para algunos mohos ubicuos, dependiendo de la concentración. La resina de *Commiphora* es ampliamente utilizada en el tratamiento de las quejas estomacales, las heridas y la diarrea en Somalia. El T-Cadinol, el sesquiterpeno farmacológicamente activo de *Commiphora* demostró tener un efecto relajante del músculo liso dependiente de la dosis sobre el íleon de cobaya aislado y un efecto inhibidor similar sobre la hipersecreción intestinal inducida por la toxina del cólera en ratones. Causó lisis bacteriana y posterior pérdida fatal de componentes intracelulares en *Staphylococcus aureus*. El exudado resinoso de *Commiphora* a veces se aplica como yeso y se usa para espasmos y fiebre. La corteza lavada, mezclada con sal, se aplica a las mordeduras de serpiente y la planta se ha utilizado como remedio estomacal y ocular. El extracto acuoso de la resina de *Commiphora* inhibió significativamente tanto la respuesta máxima al edema durante 6 h en la pata de una rata inducida por carragenano. La resina de *Commiphora* resultó ser efectiva contra depredadores y hongos patógenos. La corteza y la resina de *Commiphora* se utilizan como agente cosmético y suavizante y para tratar las mordeduras de perros. Se demostró que cierto tipo de lípidos de *Commiphora* tienen propiedades hipocolesterolémicas, antisépticas, antipatogénicas y antiparasitarias, y ayudan contra la diarrea inespecífica y la disentería [(28)].

1.1.1. Taxonomía y morfología

Es un arbusto o árbol pequeño con hojas verdes y dos foliolos laterales. Después de la época de lluvias se le hace una incisión en el tronco, que exuda una resina gomosa, amarga y aromática de color amarillo que al secarse tiene formas irregulares y tonalidad pardo-rojiza [23].

Su taxonomía es la siguiente [23]:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Burseraceae

Tribu: Bursereae

Subtribu: Burserinae

Género: *Commiphora*

Especie: *Commiphora myrrha*

1.1.2. Composición química del aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha*

1.1.2.1 Composición química del aceite esencial

La mirra (también llamada mirra amarga) es una goma-resina obtenida de varias especies de *Commiphora* (fam. *Burseraceae*), notablemente de la *C. abyssinica*, *C. schimperi, y C. myrrha*. El género *Commiphora* comprende más de 200 especies, todas nativas a África, Arabia, Madagascar e India [29].

Para recolectar chicle, los nativos hacen incisiones en la corteza, causando la exudación de una oleorresina amarillenta [29].

Expuesta al aire, ésta seca, se endurece y se vuelve marrón rojiza [29].

La mirra es parcialmente soluble en etanol (~ 30% de alcohol soluble) y también es parcialmente soluble en agua y en éter. Desde la antigüedad la mirra ha servido como un constituyente del incienso. El aceite de mirra es un ingrediente valioso en perfumes (balsámico, fuerte olor) [29].

Tabla 1 Composición química del aceite esencial *Commiphora myrrha*

Compuesto	Concentración %
Furanoeudesma-1,3-diene (familia presenta actividad antibacterial)	34.45
Lidestrene	12.9
Curzerene	8.5-40.1
Germacrone	5.8
β-elemene	8.4
ɤ-elemene	0.5
2-O-acetyl-8,12epoxigermacrama1-1(10)-4,7,11-tetraene	6.5
β-bourboneno	0.6
α- humulene	0.3
β-caryophyllene	0.7
dehydroaromadendrane	0.1
9-epi-caryophyllene 0.4	0.1
γ-muurolene	0.3
alloaromadendrene	1.7
γ-cadinene	0.8
δ-cadinene	0.3
β-sesquiphellandrene	0.2
selina-3,7(11)-diene	0.2
elemol	0.2
caryophyllene alcohol	0.4
caryophyllene oxide	0.2
cis-β-elemenone	0.8
γ-eudesmol	2.7
furanodiene	1.1
7-epi-α-eudesmol	2.2
2-hydroxyfuranodiene	0.2
10-epi-γ-eudesmol acetate	0.3

Fuente. Hanus, L.; Rezanka, T.; Dembitsky, V.; Moussaieff, A. – *Myrrh- Commiphora Chemistry.* Biomed. Papers (2005)

Los principales constituyentes del aceite esencial identificado a partir de la resina de *Commiphora myrrha* fueron: α -elemene (12.86%), 7-isopropil-1,4-dimetil-2-azulenol (12.22%), curzereno (11.64%), y germacra-1 (10) 7,11-trien-15-oicacid, 8,12-epoxi-6-hidroxi-c¸-lactona (6,20%) [29].

La goma de mirra se ha utilizado como incienso por muchos siglos. En tiempos más recientes, la goma ha encontrado usos médicos, como antiséptico, la tintura se aplica a afecciones inflamatorias y ulceras de la garganta y boca [29].

La extracción con alcohol acuoso al 90% elimina las resinas en gran medida y permitiendo así que los polisacáridos brutos sean obtenidos [29].

1.1.2.2. Composición química del aceite esencial y extracto etanólico

En cuanto al extracto hidroalcohólico preparado con la *Commiphora myrrha,* con etanol al 90% se eliminan las resinas y se aíslan polisacáridos crudos que se hidrolizan, detectándose compuestos polares del tipo ácidos, alcoholes, cetonas. Flavonas y aminoácidos han sido detectados pero no cuantificados.

Tabla 2 Composición química extracto hidroalcohólico *Commiphora myrrha*

Extracto Hidroalcólico (90%) *Commiphora myrrha*
D-galactosa*
L-arabinosa**
Acido 4-metil D-glucorónico***
Proporciones: *4:1:***3**

Fuente. Hanus, L.; Rezanka, T.; Dembitsky, V.; Moussaieff, A. – *Myrrh- Commiphora Chemistry.* Biomed. Papers (2005)

1.1.3. Usos medicinales

La mirra se usa tradicionalmente como incienso quemado que repele las pulgas y los mosquitos. Se cree que es efectivo para aliviar el dolor, incluido el dolor menstrual como resultado del estancamiento de sangre. La mirra en polvo se usa en Alemania para tratar la inflamación de la garganta y la boca. También

se usa en lesiones externas para reducir la hinchazón. Aplicado directamente a los dientes, también puede ayudar a aliviar el dolor de un dolor de muelas [30].

Los antiguos chinos usaban esta hierba para tratar heridas y hematomas; todavía se usa como un antiséptico de amplio espectro para tratar diversas dolencias como la conjuntivitis (conjuntivitis), el herpes labial y las aftas. También se cree que el uso de la mirra promueve la curación, por lo que es un ingrediente popular en los ungüentos veterinarios [30].

Tomado internamente, las propiedades antisépticas de mirra ayudan a tratar la gingivitis y los dientes flojos, y también ayudan a eliminar el mal aliento o la halitosis. Debido a las propiedades antifúngicas de la hierba, se puede utilizar como un tratamiento a base de hierbas para el pie de atleta, cándida y otras infecciones fúngicas. Se cree que es una buena hierba para reducir los niveles de colesterol, aunque los estudios clínicos son hasta ahora inconclusos [30].

Mezclada con ácido bórico y agua hirviendo, la mirra puede usarse para hacer gárgaras para la inflamación oral, dolor de garganta y problemas de encías. Gargarismos de mirra también puede ser beneficioso en otras enfermedades de la boca y la garganta, como la faringitis estreptocócica. Internamente, se ha utilizado como expectorante y para aliviar la angustia gástrica. Además, se usa para calmar o relajar el tejido muscular liso. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones para confirmar posibles propiedades contra el cáncer en mirra La Mirra tiene propiedades antimicrobianas y se usa internamente para estimular la acción de los macrófagos en el torrente sanguíneo [30].

1.2. Métodos de extracción en fitoquímica

Al inicio de un estudio en fitoquímica hay que considerar los metabolitos a estudiar, y específicamente la parte de la planta de la cual serán extraídos. De ser correctamente seleccionados implicará una importancia en la selección del método de extracción. Un material seco permite al solvente alcanzar un mayor rendimiento durante la extracción. Existen compuestos que se conservan en la estructura de la planta, pero aun así los estudios que hablan sobre la extracción de aromas, consideran que el material a utilizar se fresco. Es necesario conocer la polaridad del solvente a seleccionar; por ejemplo los

esteroles requiere un solvente como el éter de petróleo, las cumarinas son extraidas con hexano, mientras que los alcaloides requieren tanto el empleo del alcohol etílico como del ácido diluido. La alta polaridad del etanol, le permite ser ampliamente utilizado en la extracción de sustancias de todas las polaridades, siendo también poco reactivo, su evaporación es fácil y su costo es relativamente bajo (31).

1.2.1. Extracción sólido-líquido

Consiste en la extracción de un componente sólido al tener contacto con un disolvente. Fitoquímicamente la fase portadora sólida corresponde al material vegetal, mientras que el soluto resultante corresponde al extracto obtenido con el disolvente (31).

1.2.2. Maceración

Por medio de este método se obtienen extractos por un amplio tiempo de contacto que el solvente debe tener con el material vegetal. Este debe estar seco y de tamaño homogéneo, para lograr así una mayor superficie de contacto con el solvente; todo esto a temperatura ambiente. Se requieren de agitaciones constantes a fin de buscar la homogeneidad del producto resultante; esto puede influir en el rendimiento de la extracción. El solvente perderá su poder de extracción al pasar el tiempo de contacto con el material vegetal. Para estos extractos se requiere la protección de la luz solar, por una posible descomposición de sustancias fotolábiles. Una vez realizada la filtración, es necesario que se lave el material vegetal restante con más solvente para la extracción del extracto total [(31)].

1.2.3.- Percolación o lixiviación

En este método el disolvente a temperatura ambiente pasa por acción de la gravedad, sin requerirse presión alguna. El material estará homogéneo y seco. El paso del solvente por las partículas del sólido hace que la mayoría de metabolitos se disuelvan, lográndose una alta efectividad por la continua adición de solvente (31).

1.2.4. Extracción líquido-líquido

Este método está basado en la transferencia de sustancias desde una fase líquida a otra en igual estado, esto ocurre por el reparto entre las dos fase de compuestos de diversas polaridades. Una fase es acuosa y la otra es orgánica, llamada como extractante. Siendo el extractante quien transfiere los compuestos de una fase acuosa [31].

1.3 Enfermedades Dentales y Bucales

1.3.1 Placa Bacteriana

La biota microbiana oral humana representa una biopelícula muy diversa. Veinticinco especies de estreptococos orales habitan en la cavidad oral humana y representan aproximadamente el 20% de las bacterias orales totales. La taxonomía de estas bacterias es compleja y permanece provisional. Los estreptococos orales abarcan bacterias amigas y enemigas. Cada especie ha desarrollado propiedades específicas para colonizar los diferentes sitios orales sometidos a condiciones constantemente cambiantes, luchando contra competidores y resistiendo agresiones externas (sistema inmune del huésped, choques físico-químicos y fricciones mecánicas). El desequilibrio en la biota microbiana nativa genera enfermedades orales y, en las condiciones adecuadas, los estreptococos comensales pueden cambiar a patógenos oportunistas que inician la enfermedad y el daño al huésped. El grupo de "*estreptococos mutans*" se describió como la bacteria más importante relacionada con la formación de caries dental. *Streptococcus mutans*, aunque está presente de forma natural entre la microbiota oral humana, es la especie microbiana más fuertemente asociada con las lesiones cariosas [43].

La placa bacteriana es una entidad o masa estructurada específica, adhesiva, altamente variable, que se forma por el crecimiento y colonización de microorganismos sobre la superficie de los dientes, de las restauraciones y de los aparatos protésicos. A medida que los microorganismos se organizan en colonias, crecen y producen sustancias destructivas en los tejidos subyacentes [44].

Esta comunidad organizada de numerosas especies de microorganismos vivientes, agrupadas en una matriz extracelular, compuesta de productos del metabolismo bacteriano, de exudado crebicular, de la saliva y partículas de alimentos, se forma como consecuencia de la organización y proliferación de las colonias de bacterias [44].

La placa bacteriana por sí sola no es dañina, hasta que no sea colonizada por microorganismos productores de toxinas causantes de caries o de enfermedad periodontal [44].

Entre esos microorganismos, el más común es *Streptococcus mutans*, el cual coloniza en diferentes grados las superficies dentarias y contribuye así al desarrollo de la placa bacteriana y de la caries dental [44].

El ácido, producto de la fermentación bacteriana, es considerado como el responsable de la formación de caries, y no los lactobacilos, como al principio se creyó. Hoy se sabe que existe especificidad bacteriana en la etiología de la caries, y que *Streptococcus mutans* es la especie con mayor potencial cariogénico, seguida de *Streptococcus sanguis, Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis, Actinomyces sp*., los *lactobacilos* y los *enterococos. Streptococcus mutans* es considerada como la especie más cariogénica, por dos factores fundamentales: la formación de placa bacteriana gruesa y su gran capacidad acidógena. Existen varias técnicas para el análisis de la placa bacteriana. Entre ellas están la observación directa, el análisis morfológico, los estudios metabólicos in situ, los análisis bioquímicos, las técnicas microbiológicas y las pruebas para comprobar su toxicidad. Se han efectuado muchas investigaciones, tanto en animales como en humanos, para el control y reducción de la placa dental. Algunas de éstas han demostrado que hay una estrecha relación entre la cantidad de placa bacteriana y el grado de enfermedad periodontal y caries [44].

1.3.2 Caries

La caries dental se considera un proceso dinámico crónico, infeccioso, transmisible y multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos duros del diente y progresa lentamente con el tiempo con la subsecuente

pérdida de minerales de la superficie dental. Esto se refleja clínicamente como una opacidad del esmalte que puede evolucionar a grandes cavidades que comprometen la dentina, el cemento y la pulpa dental hasta la destrucción total del diente [45].

Su distribución mundial sigue siendo considerable, aunque hay reportes de una tendencia a la declinación en los países desarrollados. La población infantil y adolescente es un grupo humano muy vulnerable, y, sin ser un problema que comprometa la vida, constituye actualmente una de las patologías más frecuentes y costosas, que se presenta de por vida [45].

La etiología multifactorial de esta entidad ha sido tema de diversas investigaciones que plantean que el desarrollo de caries dental se debe, entre otras causas, a la presencia de microorganismos cariogénicos en la cavidad bucal [45].

Streptococcus mutans ha ocupado el interés de muchos investigadores desde épocas remotas; en 1890, W. Miller, microbiólogo británico, propuso la teoría quimioparasitaria para explicar el fenómeno de la caries dental, relacionando microorganismos, carbohidratos de la dieta y enfermedad dental; en 1924, Kilian Clarke, otro microbiólogo británico, aisló la bacteria *Streptococcus mutans* de lesiones cariosas. Más tarde, en la mitad del siglo xx, los esfuerzos investigativos del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos y de los países escandinavos confirmaron las propiedades cariogénicas de este microorganismo, demostrando su transmisibilidad y distribución mundial [45].

Aunque la presencia de esta bacteria es una causa determinante, no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Evidentemente, existe un amplio reconocimiento de la importancia de los factores microbiológicos en relación con la caries dental, y *Streptococcus mutans* parece tener un papel muy importante. Son numerosos y diferentes los estudios realizados sobre el tema, sin embargo, todos los autores coinciden en que la génesis de la caries dental requiere la presencia de varios factores de riesgo, de manera más significativa, la colonización por *Streptococcus mutans*, una deficiente higiene oral y un alto consumo de alimentos ricos en sacarosa [45].

1.3.3 Microorganismo

1.3.3.1 Bacterias Gram positivas y Gram negativas.- definición y características.- estructura

Las bacterias Gram-positivas son bacterias que dan un resultado positivo en la prueba de tinción de Gram, que tradicionalmente se usa para clasificar rápidamente a las bacterias en dos amplias categorías según su pared celular [32].

Las bacterias Gram-positivas retoman la tinción de cristal violeta utilizada en la prueba, y luego parecen ser de color púrpura cuando se observan a través de un microscopio. Esto se debe a que la capa gruesa de peptidoglucano en la pared celular bacteriana retiene la mancha después de eliminarla por lavado del resto de la muestra, en la etapa de decoloración de la prueba [32].

Las bacterias Gram-negativas no pueden retener la mancha violeta después de la etapa de decoloración; el alcohol utilizado en esta etapa degrada la membrana externa de las células Gram-negativas, haciendo que la pared celular sea más porosa e incapaz de retener la mancha de cristal violeta. Su capa de peptidoglicano es mucho más delgada e intercalada entre una membrana celular interna y una membrana bacteriana externa, lo que provoca que tomen la contratinción (safranina o fuchsina) y que aparezcan rojos o rosados [32].

A pesar de su capa de peptidoglicano más gruesa, las bacterias Gram-positivas son más receptivas a los antibióticos que las Gram-negativas, debido a la ausencia de la membrana externa [32].

En general, las siguientes características están presentes en bacterias Gram-positivas [32]:

- Membrana lipídica citoplásmica
- Capa gruesa de peptidoglicano

- Los ácidos teicoicos y los lipoides están presentes, formando ácidos lipoteicoicos, que sirven como agentes quelantes, y también para ciertos tipos de adherencia.

- Las cadenas de peptidoglucano se entrecruzan para formar paredes celulares rígidas mediante una enzima bacteriana DD-transpeptidasa.

- Un volumen de periplasmo mucho más pequeño que el de las bacterias Gram negativas.

Solo algunas especies tienen una cápsula, generalmente compuesta de polisacáridos. Además, solo algunas especies son flagelados, y cuando sí tienen flagelos, solo tienen dos anillos basales en el cuerpo que los sostienen, mientras que los Gram negativos tienen cuatro. Tanto las bacterias Gram-positivas como Gram-negativas comúnmente tienen una capa superficial llamada capa S. En bacterias Gram-positivas, la capa S se une a la capa de peptidoglicano. La capa S de bacterias Gram-negativas se une directamente a la membrana externa. Algo específico para bacterias Gram-positivas es la presencia de ácidos teicoicos en la pared celular. Algunos de estos son ácidos lipoteicoicos, que tienen un componente lipídico en la membrana celular que puede ayudar a anclar el peptidoglicano [(33)].

Aunque las bacterias se dividen tradicionalmente en dos grupos principales, Gram-positivas y Gram-negativas, en función de su propiedad de retención de la tinción de Gram, este sistema de clasificación es ambiguo ya que se refiere a tres aspectos distintos (tinción del resultado, organización, grupo taxonómico), que no necesariamente se fusionan para algunas especies bacterianas. La respuesta de tinción Gram-positiva y Gram-negativa tampoco es una característica confiable, ya que estos dos tipos de bacterias no forman grupos filogenéticos coherentes [(33)].

Sin embargo, aunque la respuesta de tinción de Gram es un criterio empírico, su base radica en las diferencias marcadas en la ultraestructura y composición química de la pared celular bacteriana, marcada por la ausencia o presencia de una membrana lipídica externa [(33)].

Todas las bacterias Gram-positivas están limitadas por una membrana lipídica de una sola unidad y, en general, contienen una capa gruesa (20-80 nm) de peptidoglicano responsable de retener la tinción de Gram. Varias otras bacterias, que están limitadas por una sola membrana, pero que se tiñen de Gram negativo debido a la falta de la capa de peptidoglicano, como en Mycoplasmas, o su incapacidad para retener la tinción de Gram debido a su composición de pared celular, también muestran estrecha relación con las bacterias Gram-positivas. Para las células bacterianas limitadas por una sola membrana celular, se ha propuesto el término "bacterias monodermas" o "procariotas monodermos" [33].

A diferencia de las bacterias Gram-positivas, todas las bacterias Gram-negativas arquetípicas están limitadas por una membrana citoplásmica y una membrana celular externa; contienen solo una fina capa de peptidoglicano (2-3 nm) entre estas membranas. La presencia de membranas celulares internas y externas define un nuevo compartimento en estas células: el espacio periplásmico o el compartimiento periplásmico. Estas bacterias han sido designadas como "bacterias didermas". La distinción entre las bacterias monodermas y didermas está respaldada por indeles característicos conservados en varias proteínas importantes. De estos dos grupos estructuralmente distintos de bacterias, los monodermos están indicados como ancestrales. En base a una serie de observaciones que incluyen que las bacterias Gram-positivas son los principales productores de antibióticos y que, en general, las bacterias Gram-negativas son resistentes a ellas, se ha propuesto que la membrana celular externa en bacterias Gram-negativas (didermas) ha evolucionado como un mecanismo de protección contra la presión de selección de antibióticos. Algunas bacterias, como Deinococcus, que tiñen Gram-positivas debido a la presencia de una gruesa capa de peptidoglicano y también poseen una membrana celular externa se sugieren como intermedios en la transición entre las bacterias monodermas (Gram-positivas) y didermas (Gram-negativas). La bacteria didermas también se puede diferenciar entre didermas simples que carecen de lipopolisacárido, la bacteria diderma arquetípica donde la membrana celular externa contiene

lipopolisacárido y la bacteria diderma donde la membrana celular externa está compuesta de ácido micólico [34].

En general, las bacterias Gram-positivas son monodermos y tienen una única bicapa lipídica, mientras que las bacterias Gram-negativas son didermas y tienen dos bicapas. Algunos taxones carecen de peptidoglicano (como el dominio Archaea, la clase Mollicutes, algunos miembros de los Rickettsiales, y los insecto-endosimbiontes de los Enterobacteriales) y son Gram-variable. Esto, sin embargo, no siempre es cierto. Las bacterias Deinococcus-Thermus tienen tinciones Gram-positivas, aunque son estructuralmente similares a las bacterias Gram-negativas con dos capas. Los Chloroflexi tienen una sola capa, pero (con algunas excepciones tienen una tinción negativa [35].

Algunas especies *Firmicute* no son Gram-positivas. Estos pertenecen a la clase *Mollicutes* (alternativamente considerada una clase del phylum Tenericutes), que carecen de peptidoglicano (Gram-indeterminado), y la clase *Negativicutes*, que incluye *Selenomonas* y tinción Gram-negativa. Además, se encuentra que una cantidad de taxones bacterianos (a saber, *Negativicutes*, *Fusobacteria*, *Synergistetes* y *Elusimicrobia*) que son parte del filo *Firmicutes* o rama en su proximidad poseen una estructura de células didermas. Sin embargo, un indel (CSI) característico conservado en la proteína HSP60 distingue a todos los fila tradicionales de bacterias Gram-negativas (p. Ej., P*roteobacteria*, *Aquificae*, *Chlamydiae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, Cianobacteria, *Fibrobacter, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Spirochetes, Acidobacteria*, etc.) de estas otras bacterias didermas atípicas, así como de otros fila de bacterias monodermas (por ejemplo, *Actinobacteria, Firmicutes, Thermotogae, Chloroflexi*, etc.). La presencia de este CSI en todas las especies secuenciadas de fila bacteriana Gram negativa convencional que contiene LPS (lipopolisacáridos) proporciona evidencia de que estos filamentos de bacterias forman un clado monofilético y que no se ha producido ninguna pérdida de la membrana externa de ninguna especie de este grupo [34].

En el sentido clásico, seis géneros Gram-positivos son típicamente patógenos en humanos. Dos de estos, *Streptococcus y Staphylococcus*, son cocos (en

forma de esfera). Los organismos restantes son bacilos (en forma de bastón) y se pueden subdividir en función de su capacidad para formar esporas. Los formadores sin esporas son *Corynebacterium* y *Listeria* (un cocobacilo), mientras que *Bacillus* y *Clostridium* producen esporas. Las bacterias formadoras de esporas se pueden dividir nuevamente en función de su respiración: *Bacillus* es un anaerobio facultativo, mientras que *Clostridium* es un anaerobio obligado. Además, *Rathybacter, Leifsonia y Clavibacter* son tres géneros Gram-positivos que causan enfermedades en las plantas. Las bacterias grampositivas son capaces de causar infecciones graves y, a veces, fatales en recién nacidos [36].

La transformación es uno de los tres procesos de transferencia horizontal de genes, en los que el material genético exógeno pasa de una bacteria donante a una receptora, los otros dos procesos son la conjugación (transferencia de material genético entre dos células bacterianas en contacto directo) y la transducción (inyección de ADN bacteriano del donante por un virus bacteriófago en una bacteria huésped receptora). En la transformación, el material genético pasa a través del medio intermedio, y la absorción es completamente dependiente de la bacteria receptora [37].

1.3.3.2 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans son bacterias con forma de cocos grampositivos. Estos anaerobios facultativos se encuentran comúnmente en la cavidad oral humana, y son un importante contribuyente de la caries dental. El resultado de la descomposición puede afectar en gran medida la salud general del individuo [38].

Streptococcus mutans es mesofílico y crece a temperaturas entre 18-40 grados Celsius, es un microorganismo cariogénico que descompone el azúcar en energía y produce un ambiente ácido que desmineraliza la estructura superficial del diente. El resultado de la conversión desintegra el recubrimiento del diente y luego disuelve la molécula de calcio creando un agujero. La transmisión de *Streptococcus mutans* se puede encontrar en personas de todas las edades, aunque es más común en bebés y niños. La transferencia de

genotipos es responsable de la transmisión de *S. mutans* de las madres a sus hijos, aunque existe una variación genotípica de una población a la siguiente. Una persona con una flora oral saludable tendrá aproximadamente 10.000 UFC por mL de *Streptococcus Mutans* en la boca [38].

El *Streptococcus Mutans* posee tres factores de virulencia: glicanos insolubles en agua, tolerancia ácida y producción de ácido láctico. Un dolor de muelas es el síntoma más común de caries dental. Una infección o irritación de la pulpa del diente generalmente causa dolor. El dentista generalmente es la persona que diagnostica la caries dental al tomar radiografías, y algunas veces los rayos X pueden detectar la formación de una cavidad antes de que esté completamente intacta. Si se le diagnostica caries dental, existen muchas opciones de tratamiento tales como: empastes, coronas y conductos radiculares. Dado que cada ser humano tiene bacterias en la boca, la única prevención es disminuir el impacto de la fermentación ácida mediante la práctica de una higiene oral adecuada [38].

Streptococcus mutans se considera parte de la flora "normal" de la boca humana, se asocia con la caries dental. La caries dental es una enfermedad dental infecciosa y transmisible que afecta a personas de todas las edades. *Streptococcus mutans* puede transmitirse de una persona a otra a través de una transmisión horizontal o vertical. La ruta de transmisión de *Streptococcus mutans* es la de colonizarse entre huéspedes humanos. Los niños y los bebés son más propensos al diagnóstico de esta bactaeria y los estudios muestran que muchos lo reciben de sus cuidadores principales. *Streptococcus Mutans* se favorece de las superficies duras que no se desprenden para establecer colonias permanentes, lo que implica que los niveles de *Streptococcus Mutans* no se detectan en los bebés hasta que los dientes primarios se extravasan, aunque estudios recientes han demostrado que la bacteria puede colonizar surcos de la lengua en infantes prenatados [38].

Típicamente, entre las edades de uno y dos años, erupcionan los dientes, lo que permite a *Streptococcus Mutans* establecer colonias florecientes en los dientes y causa caries. La indicación de la formación de cavidades es la aparición de niveles detectables de bacterias en los dientes. Cuando se detecta

Streptococcus mutans en los surcos de la lengua, se concluye que la ruta de transmisión vertical de la bacteria de madre a hijo surge poco después del nacimiento. Para probar esto, se tomaron muestras de saliva de niños de dos a cinco años de edad, lo que reveló una alta fidelidad en la composición genética de la población de *Streptococcus mutans* de cada huésped. Estos experimentos también concluyeron que el ADN del plásmido se correlaciona con diferentes tasas, lo que implica principalmente la transmisión vertical. Es probable que las madres con grandes cantidades de bacterias o aquellas que han sufrido muchas caries dentales transmitan los mismos factores de virulencia a sus hijos. Cuando los niveles salivales de *Streptococcus mutans* de la madre superan las 105 unidades formadoras de colonias, tienen nueve veces más probabilidades de transmitirles bacterias a sus hijos [38].

El crecimiento y el metabolismo del *Streptococcus mutans* cambian las condiciones ambientales de la flora oral, lo que permite colonizar organismos exigentes y causar la formación de placa dental. El *Streptococcus mutans* es un microorganismo especializado equipado con receptores que le permiten adherirse a la superficie del diente creando un ambiente viscoso. Después de la adherencia al diente, *Streptococcus mutans* comienza a dividirse y produce microcolonias dentro de la capa de limo para construir una biopelícula. La bacteria comienza a crecer y sintetiza dextrano con la enzima dextransucrasa. El dextrano contiene una cápsula que se une al esmalte y forma una biopelícula que consta de 300-500 células bacterianas. El biofilm metaboliza *Streptococcus Mutans* y es capaz de escindir sacarosa con la enzima glucasucrasa. Con estos productos, la fructosa se fermenta como fuente de energía para el crecimiento bacteriano, mientras que la glucosa se polimeriza en un polímero de dextrano extracelular. Esto es importante porque el polímero cementa *Streptococcus Mutans* en el esmalte y se convierte en la matriz de la placa dental. La dextrina también se puede despolimerizar a glucosa y utilizar el monosacárido como fuente de carbono, que produce ácido láctico en el biofilm por descalcificación del esmalte, y conduce a la caries dental. La combinación de ácido y placa da como resultado el agente causante de la descomposición [38].

1.3.3.2.1 Morfología

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas [(39)].

1.3.3.2.2 Metabolismo

La expansión de los genes relacionados con la absorción de hidratos de carbono y el metabolismo parece haber sido un avance evolutivo esencial contribuyendo al éxito del *Streptococcus mutans* como patógeno de caries en biofilms microbianos orales. El transporte de oligosacáridos, incluidos melibiosa, rafinosa, estaquiosa y maltodextrinas, es principalmente llevado a cabo por la actividad de unión transportadores ATP (ABC) codificados en el genoma de *Streptococcus Mutans*, que incluye el metabolismo múltiple de azúcar (*msm*) y sistemas de transporte *malXFGK*, siendo la ruta predominante para la captación de mono y disacáridos la ruta del fosfoenolpiruvato, conocida como: Sistema Azúcar Fosfotransferasa (PTS) [(40)].

El PTS consiste mínimamente de Enzima I (EI) y HPr (proteína contenedora de histidina), que participan en una reacción de fosfotransferencia a una variedad de Enzima II (EII), que es una permeasa, que fosforila concomitantemente e internaliza un espectro de mono o disacáridos [(40)].

La mayoría de estas permeasas son albergadas por gran parte de las cepas, pero hay algunas que solo están presentes en aislamientos particulares. Sin dudas, esta diversidad de fuentes de carbohidratos que pueden ser internalizadas por *Streptococcus mutans* contribuye a su potencial patogénico [(40)].

Estudios recientes sugieren que componentes accesorios adicionales pueden ser necesarios para la funcionalidad completa de ciertos complejos EII. Por ejemplo, un marco de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés), que codifica una proteína hipotética, ubicada dentro del operón de utilización de la celobiosa del *Streptococcus mutans*; siendo esto necesario para una eficiente internalización de la celobiosa [(40)].

El *Streptococcus mutans* es fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas [(19)].

1.3.3.2.3 Reproducción

El *Streptococcus mutans* se reproduce de manera asexual por fisión binaria, esto quiere decir por división celular que produce dos células hijas idénticas. El cromosoma dentro de la célula se adhiere a la membrana plasmática, cuando se une el cromosoma se replica. Una vez que el cromosoma se replica, los dos cromosomas hijas se unen a diferentes sitios en la membrana plasmática. Luego se forma un anillo contráctil de fibras FtsZ entre los dos cromosomas. Las fibras FtsZ son el principal componente del citoesqueleto de las bacterias. A medida que el anillo FtsZ se cierra, el citoplasma se divide en dos y se completa la división [(41)].

1.3.3.2.4 Clasificación

a). *Streptococcus mutans* subespecie *mutans*. Cocos grampositivos en parejas y cadenas, fermentadores de manitol, sorbitol, rafinosa e inulina. Productores de glucano a partir de sacarosa [(42)].

Crecen aeróbicamente pero requieren CO2 para un crecimiento óptimo. No producen amoníaco a partir de la arginina [(42)].

La composición de base su ADN es 36 a 38 mol % guanina más citosina. Las cepas en esta subespecie reaccionan con el antisuero del grupo c Bratthall.

Algunas cepas también reaccionan con el antisuero del grupo E de Lancefield [42].

b). *Streptococcus Mutans* subsp. *rattus*. Originalmente aislado de una rata (género Rattus). Son cocos grampositivos en pares y cadenas. Fermentadores de manitol, sorbitol, rafinosa e inulina. Productores de glucano a partir de sacarosa. Crecen en el aire pero necesitan CO2 para un crecimiento óptimo. Productores de amoniaco a partir de arginina. Su composición de base de ADN es 41 a 43 mol% guanina más citosina. Las cepas en esta subespecie reaccionan con el antisuero del grupo b Bratthall [42].

c). *Streptococcus mutans* subsp. *sobrinus*. Esta subespecie es la menos relacionada con *Streptococcus mutans* subsp. mutans. Son cocos gram positivos en pares y cadenas. Fermentadores de manitol, inulina y usualmente sorbitol. No fermentan rafinosa. Son productores de glucano a partir de sacarosa. No producen amoníaco a partir de la arginina. Crecer en aire pero requieren CO2 para un crecimiento óptimo. Composición de base de ADN 44 a 46 mol %guanina más citosina. Las cepas en esta subespecie reaccionan con antisuero d Bratthall [42].

d). *Streptococcus mutans* subsp. *Cricetus*. Su nombre proviene del checo Krecek (hamster). Originalmente aislado de un hámster (género Cricetus, o Mesocricetus). Son cocos grampositivos en pares o cadenas. Fermentadores de manitol, sorbitol, rafinosa e inulina. Productores de glucoanos a partir de la sucrosa. Requieren de CO2 o de tensión de oxígeno reducido. No producen amoniaco a partir de la arginina. Su composición de DNA base es de 42-44% mol guanina más citosina. Las cepas de estas especies reaccionan con el anticuerpo alfa Bratthall [42].

1.4 Conclusiones del capítulo

- Los compuestos fenólicos de *Commiphora myrrha* poseen actividad antimicrobiana.
- Los principales constituyentes del aceite esencial identificado a partir de la resina de *Commiphora myrrha* fueron: α -elemene (12.86%), 7-isopropil-1,4-dimetil-2-azulenol (12.22%), curzereno (11.64%), y germacra-1 (10) 7,11-trien-15-oicacid, 8,12-epoxi-6-hidroxi-c¸-lactona (6,20%).
- El etanol es un solvente estable, de fácil evaporación durante la extracción de sustancias de diversas polaridades.
- La capacidad del etanol de atravesar las membranas de las células de las muestras orgánicas le permite extraer las moléculas polares como los polifenoles totales y flavonoides de la mirra.
- La caries dental es causada por la bacteria *Streptococcus mutans* que habita en el biofilm de la cavidad bucal, dicha bacteria es de tipo Gram positiva.
- El Streptococcus mutans posee tresvfactores de virulencia: glicanos insolubles en agua, tolerancia ácida y producción del ácido láctico.

CAPITULO II

MARCO METODOLÓGICO Y PLANTEAMIENTO DE LA PROPIUESTA

2. Caracterización del sector

El presente trabajo de investigación es de tipo cualitativo y cuantitativo, de diseño cuasi experimental. Por su alcance se trata de una investigación correlacional.

El estudio etnofarmacológico se realizó en el sector Sauces, etapas 1,2 y 7 ubicadas en el norte de la ciudad de Guayaquil. Sector que cuenta con una población de 76.540 según el Centro de estudios e Investigaciones Estadísticas ICM-ESPOL, la muestra de la especie vegetal fue recolectada en el Mercado de Transferencias de Víveres de Guayaquil, lugar donde se pueden encontrar gran diversidad de plantas medicinales del Ecuador.

2.1 Descripción de procedimiento metodológico

Existen tres etapas para la implementación de la propuesta de la investigación:

- Estudio etnofarmacológico
- Obtención de aceite esencial y extracto etanólico
- Estudio microbiológico

2.1.1 ETAPA 1: Estudio Etnofarmacológico

Criterios de inclusión: personas habitantes del sector Sauces, etapas 1, 2 y 7 en edades comprendidas entre 40 y 80 años.

Criterios de exclusión: personas que no son habitantes del sector en estudio y personas en edad comprendida de 0 a 39 años y de 81 años en adelante.

Materiales y métodos

Material

- Encuesta

Método

El estudio es de tipo transversal y descriptivo. Es descriptivo porque se describió la utilización de plantas medicinales por persona encuestada, y es transversal porque se estudia de forma simultánea en un momento dado.

Para el estudio etnofarmacológico se ha seleccionado a personas que habitan en la Ciudadela Sauces en la etapa 1 el 33%, etapa 2 el 33% y en la etapa 7 el 34% de la población, sector ubicado al Norte de la ciudad de Guayaquil. El sector es de clase media, familias nucleadas de padres, abuelos e hijos. La población muestreada está constituida por los adultos de un grupo etario de 40 a 80 años.

2.1.1.1. Universo y muestra

El número de personas encuestadas es determinó aplicando la fórmula para población binomial.

Tabla 3 Universo y muestra

HOGARES ENCUESTADOS	NÚMERO DE HOGARES	ADULTOS 40-80 AÑOS
SAUCES 1	125	174
SAUCES 2	220	286
SAUCES 7	260	414
TOTAL	605	874

Realizado por: Autora

Muestra

Considerando que el universo es finito y una población de 874 personas, se aplica la siguiente ecuación para población binomial:

$$n = \frac{K^2 \times N \times P \times Q}{e^2 \ (N-1) + K^2 \times P \times Q}$$

Donde:

n: tamaño de la muestra

N: tamaño de la población (874 personas)

K: coeficiente que tiene en cuenta el nivel de confianza (2)

e: error con que se trabaja (10%)

P: % de la población que reúne las características de interés (50%)

Q: % de la población que no reúne las características de interés (50%)

$$\mathrm{n} = \frac{2^2 \text{ x } 874 \text{ x } 0.5 \text{ x } 0.5}{0.1^2\ (874 - 1) + 2^2 \text{ x } 0.5 \text{ x } 0.5}$$

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{2^2 \text{ x } 874 \text{ x } 0.5 \text{ x } 0.5}}{\mathbf{0.1^2\ (874 - 1) + 2^2 \text{ x } 0.5\ x\ 0.5}}$$

$$\mathrm{n} = \frac{874}{9.73} = 89.8$$

n = 90

Tamaño de la muestra: 90 personas

El número de la muestra para este el presente estudio es de 90 personas comprendidas en edades entre 40 a 80 años.

Nivel de uso significativo de especies del estudio etnofarmacológico.

La metodología propuesta por Germosén Robineau (1995), permite estimar el nivel de uso significativo para cada especie y verificar su aceptación cultural. Esta metodología, expresa los usos medicinales que son citados con una frecuencia superior o igual al 20%, por las personas encuestadas que usan plantas medicinales.

UST= Uso Especie (s) 100 / Nis

Donde:

Uso Especie (s) = número de citaciones para cada especie

Nis= número de informantes encuestados

Índice de valor de uso de las plantas medicinales del estudio etnofarmacológico

Esta metodología da a conocer la cantidad de usos que se otorga a una determinada planta medicinal.

Se aplica mediante siguiente fórmula:

$$VUs = \frac{\Sigma\ VUis}{ns}$$

Donde:

VUis= es el valor de uso atribuido a una especie particular (s) por un informante (i).

ns= número total de informantes entrevistados acerca de una especie en particular (s).

2.1.2 ETAPA 2: Obtención de aceite esencial y extracto etanólico

Caracterización Botánica

La caracterización botánica de mirra *Commiphora myrrha* fue realizada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil, anexo 1.

Criterios de inclusión: todas las resinas secas.

Criterios de exclusión: resinas humedecidas, con daños de putrefacción.

Materiales y métodos

Materiales

- Equipo de Destilación de Arrastre de vapor
- Balón de extracción
- Cilindros 250ml
- Balón 250 ml
- Rota vapor
- Agitador de vidrio

Métodos

- **Obtención de aceite esencial**

  Destilación por arrastre de vapor

Se toman 100g de resina, muestra secada y triturada bajo el criterio de inclusión. Se conservan en refrigeración por un máximo de 2 horas, previo a la destilación.

Colocar en el balón A agua destilada, en el balón B la muestra, ensamblar el equipo de destilación para arrastre de vapor y proceder a recoger el destilado, verificar que el lugar tenga ventilación adecuada. Una vez colectado el líquido que debe tener un color blanco lechoso, se procede a sangrarlo con Cloruro de Sodio y extraerlo con cloroformo. Guardar el aceite esencial obtenido en frascos ámbar de tapa rosca. Repetir el procedimiento hasta agotar la muestra. El proceso llevará alrededor de 3-5 días.

- **Obtención de extracto etanólico**

  Maceración

Luego de la recolección de la resina de mirra bajo el criterio de inclusión se procedió a su secado a 40°C, posteriormente se trituraron manualmente hasta lograr una cantidad de 72 g.

Se da preferencia al uso de etanol como solvente porque los compuestos alcohólicos rompen la membrana celular y pueden dar lugar a la extracción de grandes cantidades de material endocelular [46].

Pesar 25 g. de droga seca y molida y extraerlos con 200 ml de éter etílico por maceración durante 48 horas. Se obtiene el extracto y el residuo sólido (secar y pesar).

A la droga agotada con el éter etílico, extraer por maceración con etanol al 75% (tres veces el peso del residuo en volumen) durante 48 horas se obtiene el extracto y el residuo sólido (secar y pesar).

2.1.3 ETAPA 3: Estudio Microbiológico

Criterios de inclusión: La cepa a utilizar será la correspondiente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); dicha cepa no ha presentado previo contacto alguno con bacteria o solución antimicrobiana; se tomarán en consideración las normas de Bioseguridad para la manipulación de la misma.

En aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha* serán embebidos los discos de papel filtro, donde se conoce experimentalmente que los halos se inhiben con una dispersión de alrededor de 12 mm.

El medio donde se cultivará el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) será el agar Mueller Hinton para posteriormente colocar los discos de papel filtro embebido del aceite esencial y extracto etanólico en las diluciones 25%, 50%, 75% y 100% [20].

Criterios de exclusión: Cepa del microorganismo contaminada

Materiales y métodos

Materiales

- Agar Mueller Hinton
- Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Incubadora de convección natural S41i
- Autoclave 4002518 para esterilización JP selecta
- Estufa ED50
- Reverbero
- Mechero

- Cajas de Petri
- Asa de platino
- Sensidiscos
- Barilla de vidrio
- Matraz Erlenmeyer de 500ml

Método

El diseño cuasi experimental de esta investigación implica el observar el efecto del extracto etanólico y el aceite esencial de mirra sobre *Streptococcus mutans.*

Esta investigación se hará de manera cuali-cuantitativa, siendo de tipo descriptiva y exploratoria. Al final se hará un análisis de resultados con métodos estadísticos que permitirán establecer la discusión final.

Procedimiento microbiológico

Diluciones del aceite esencial y extracto etanólico

Se utiliza concentraciones para el aceite esencial y extracto etanólico al concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, para lo cual se aplica la siguiente ecuación:

$$V_1C_1=V_2C_2$$

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se cultivan en tubos de ensayo con tapa rosca que contienen el medio Soya Tripticasa, son incubadas a 37°C a fin de obtener colonias más jóvenes. Una vez cumplidas las 24 horas se agrega solución salina estéril de modo que se obtendrá una turbidez semejante al tubo número 1 de la escala de Mac Farland

Se recomienda hacer girar entre las manos los tubos que contienen la bacteria estudiada antes de proceder al sembrado permitiendo así una correcta distribución de los microorganismos [(31)].

El control positivo será la Clorhexidina al 2%, mientras que el agua destilada es el control negativo.

El método de difusión en disco se realiza por triplicado, consiste en una siembra de las cepas diluidas sobre el agar Mueller Hinton y luego se coloca en la superficie de la placa seis discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, estos papeles estarán impregnados con 0, 2 mL de cada una de las diluciones de aceite esencial usándose agua destilada como control negativo. Se procede a la incubación a 37°C por 24 horas. Ambas pruebas se realizaron por triplicado. Luego se mide el diámetro de los halos de inhibición para posteriormente realizar el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, mediante la siguiente expresión [47]:

$$\text{\% efecto inhibitorio} = \frac{\text{Media diámetro halo de inhibición}}{\text{Diámetro halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

MARTÍNEZ, M. 1996. Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Áloe vera (sábila). Figura. Recuperado: Rev. Cubana Plant Med. 1(3):18-20

La determinación de los intervalos en milímetro de los halos de inhibición de crecimiento de microorganismos fue determinada por medio la escala de Duraffourd que demuestra la sensibilidad de la bacteria frente al aceite esencial y el extracto etanólico [48].

- ✓ Nula si es inferior a 6 mm
- ✓ Sensibilidad límite de 6 - 14 mm
- ✓ Sensibilidad media de 14 - 20 mm
- ✓ Sumamente sensible superior a 20 mm

2.2. Conclusiones parciales

- La identificación botánica de *Commiphora myrrha* fue realizada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil.
- El método de destilación por arrastre de vapor de agua aceite esencial permite obtener el aceite esencial de mayor pureza.

- La polaridad del aceite esencial de mirra permite la preparación de las diluciones como emulsiones para las determinaciones microbiológicas.
- Es posible obtener una evaluación microbiológica medible mediante la prueba de difusión en disco.
- La técnica de difusión de disco permite desarrollar el estudio cuali-cuantitativo del efecto inhibitorio de la muestra ante la bacteria, pues ubica la sensibilidad de acuerdo a la Escala de Duraffourd, mediante la medida del ancho del halo de inhibición en mm.

CAPITULO III

MARCO PROPOSITIVO

3.- ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.- ESTUDIO ETNOFARMACOLÓGICO DE PLANTAS MEDICINALES.-

UBICACIÓN DE *Commiphora myrrha*

Este estudio se realizó en la ciudad de Guayaquil en el sector Sauces, etapas 1,2 y 7 esto en el norte de la ciudad. El número de muestra a encuestar es de 90 personas comprendidas en edades entre 40 a 80 años por tener mayor conocimiento en usos de plantas medicinales.

Procesamiento de datos del cuestionario etnofarmacológico:

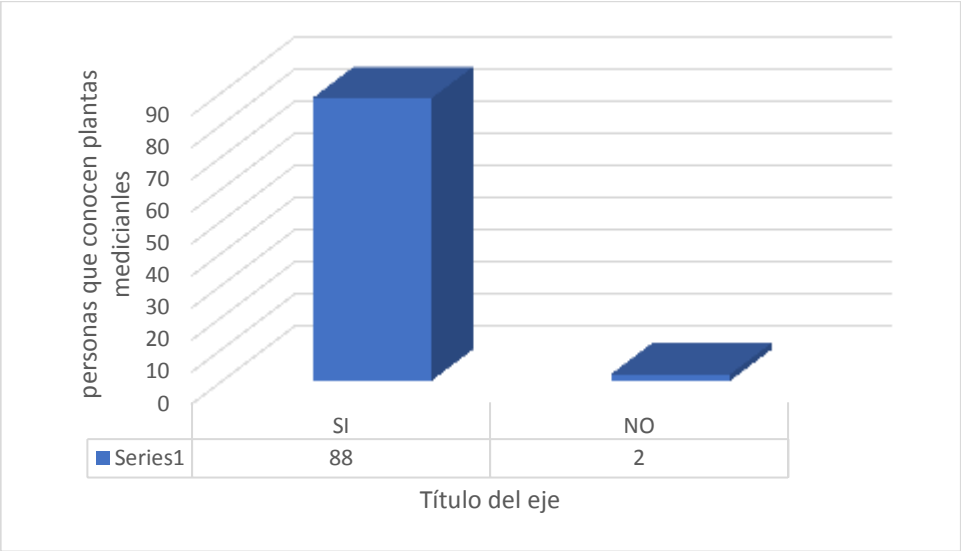
En este estudio se identificaron 16 especies de plantas medicinales, de las cuales se determinó el nivel de uso significativo y el índice del valor de uso.

¿Conoce Ud. alguna (s) planta (s) utilizada(s) con fines medicinales?

Tabla 4 Personas que conocen plantas medicinales

SI	NO
88	2

Gráfico 1 Personas que conocen plantas medicinales



Fuente: Encuestas
Realizado: Autora

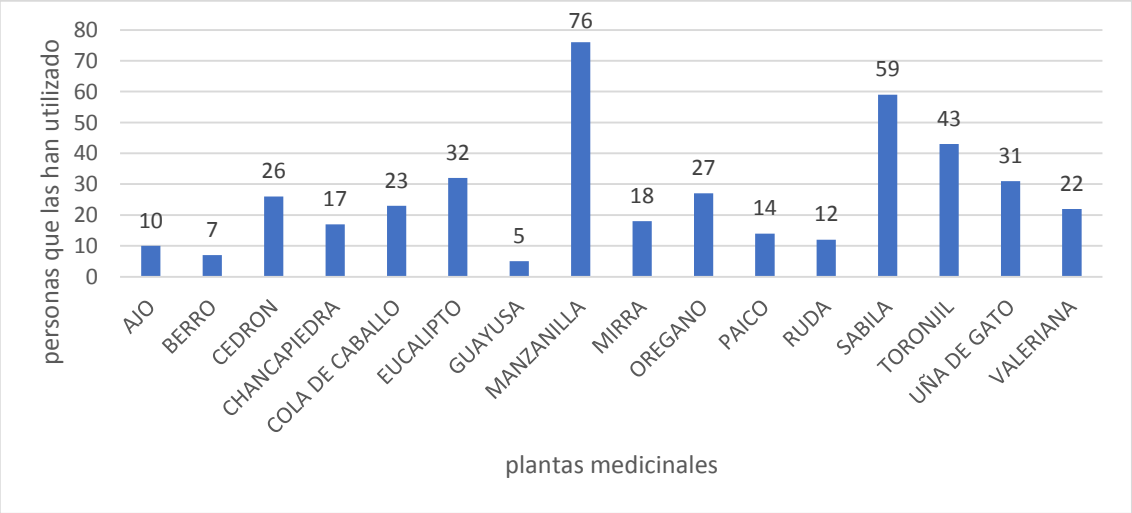
Gráfico 1, de las 90 personas encuestadas el 98 % indicó conocer o haber utilizado alguna planta medicinal, mientras que el 2 % indicó que no conoce o ha usado plantas medicinales.

Tabla 5 Plantas utilizadas con fines medicinales

PLANTAS UTILIZADAS CON FINES MEDICINALES	CANTIDAD
AJO	10
BERRO	7
CEDRON	26
CHANCAPIEDRA	17
COLA DE CABALLO	23
EUCALIPTO	32
GUAYUSA	5
MANZANILLA	76
MIRRA	18
OREGANO	27
PAICO	14
RUDA	12
SABILA	59
TORONJIL	43
UÑA DE GATO	31
VALERIANA	22

Se registra la cantidad de personas que mencionaron la misma planta utilizada con fines medicinales.

Gráfico 2 Plantas utilizadas con fines medicinales en el sector Sauce, etapas 1,2 y 7 Guayaquil.



Realizado por: Autora

Gráfico 2, Las personas encuestas indicaron conocer 16 plantas medicinales, el 86,3% nombraron la manzanilla, 67% indicaron conocer la sábila y el 36,3% mencionó el eucalipto.

Para determinar el nivel de uso significativo de cada especie se utilizó la metodología propuesta por Germosén Robineau (1995) quien manifiesta que aquellos usos medicinales que son citados con una frecuencia superior o igual al 20%, por las personas encuestadas que usan plantas como primer recurso para un determinado problema de salud, pueden considerarse significativos desde el punto de vista de su aceptación cultural y, por lo tanto, merecen su evaluación y validación científica. Esta expresión se demuestra con siguiente ecuación:

UST = UsoEspecie(s) 100 /Nis

Dónde:

Uso Especie (s) = número de citaciones para cada especie.

Nis = número de informantes encuestados.

Reemplazando los valores tendremos: El número de citaciones de la mirra por las personas encuestadas fue 18.

UST = Uso Especie(s) 100 /Nis

UST= 18*100/99

UST= 20 %

Por lo tanto la mirra obtuvo un valor de uso de aceptación cultural y por lo que merece ser investigada.

Tabla 6 Nivel de uso significativo de las plantas utilizadas con fines medicinales del estudio etnofarmacológico.

PLANTAS UTILIZADAS CON FINES MEDICINALES	NÙMERO DE CITACIONES POR CADA ESPECIE	NIVEL DE USO SIGNIFICATIVO
AJO	10	11.11 %
BERRO	7	7.7 %
CEDRON	26	28.8 %
CHANCAPIEDRA	17	8.8 %
COLA DE CABALLO	23	25.5 %
EUCALIPTO	32	35.5 %
GUAYUSA	5	5.5 %
MANZANILLA	76	84.4 %
MIRRA	18	20 %
OREGANO	27	30 %
PAICO	14	15.5 %
RUDA	12	13.3 %
SABILA	59	53.1 %
TORONJIL	43	47.7 %
UÑA DE GATO	31	34.4 %
VALERIANA	22	24.4 %

Tabla 6. De las dieciséis plantas del estudio etnofarmacológico diez de ellas presentaron un Nivel de Uso Significativo igual o mayor al 20% dentro de las cuales se encuentra la mirra motivo de esta investigación.

¿La(s) ha utilizado Ud. alguna vez? ¿Para qué? (Indicación) Si: __ No

Tabla 7 Utilización de la planta

Mirra	**dermatológico**
	antiséptico

Realizado por: Autora

Tabla 7. Los usos atribuidos a la Mirra fueron como dermatológico de la piel del rostro y antiséptico en heridas de la piel.

Para determinar el índice del valor de uso para cada especie mencionada y verificar su aceptación cultural, se empleó el concepto de Valor de Uso (Philips y Gentry, 1993).

Expresado mediante la siguiente formula:

$$VUs = \frac{\Sigma VUis}{ns}$$

Donde:

VUis= es el valor de uso atribuido a una especie particular (s) por un informante (i).

ns= número total de informantes entrevistados acerca de una especie particular(s).

Reemplazando los valores serian:

$$\boldsymbol{VUs} = \frac{\mathbf{2}}{\mathbf{90}} = 0.022$$

Por lo tanto el valor de uso de la mirra es 0.022

Tabla 8 Índice del nivel de uso de las plantas medicinales utilizadas

PLANTAS CON FINES MEDICINALES	VALOR DE USO ATRIBUÌDO A UNA ESPECIE	ÌNDICE DE NIVEL DE USO
AJO	2	0,022
BERRO	2	0,022
CEDRON	2	0,022
CHANCAPIEDRA	2	0,022
COLA DE CABALLO	2	0,022
EUCALIPTO	1	0,011
GUAYUSA	2	0,022
MANZANILLA	3	0,033
MIRRA	2	0,022
OREGANO	1	0,011
PAICO	1	0,011
RUDA	1	0,011
SABILA	2	0,022
TORONJIL	1	0,011
UÑA DE GATO	1	0,011
VALERIANA	1	0,011

Realizado por: Autora

Tabla 8. Refleja el valor de uso de las 16 especies de plantas utilizadas por las personas encuestadas.

Tabla 9 Estudio Etnofarmacológico Plantas Medicinales.- Guayaquil, Sector Sauces 1, 2 Y 7

PLANTA	INDICACION USO	SUGERIDA POR	MODO DE USO	PARTE DE PLANTA USADA	MODO DE PREPARACION	ADQUIRIR PLAN-TA	DURACION TRATAMIENTO			RESULTADOS			PLANTA RECIBIO ESTUDIO CIENTIFICO?	CONTRA INDICA-CION	EN QUE PERSONAS LAS HA USADO
							un dia	una semana	un mes		solo	con			
AJO	**ANTIBIOTICO DIABETES**	AMIGO	Crudo	Bulbo	Pelar Bulbos y Tragar	Tienda Merca-Dos		Si		mejora	Si	-	-	úlcera	Adulto
BERRO	**INFLAMACION, HEMORRAGIA**	AMIGO	Crudo	Hojas	Licuar hojas	Mercados		Si		mejora	Si	-	-	no	Adulto anciano
CEDRON	**DOLOR ESTOMACAL PRESION**	FAMILIA	Infusión	Hojas	Té	Nercados	Si			mejora	Si	-	-	no	Adulto anciano
CHACA-PIEDRA	**INFLAMACION VIAS URINARIAS CALCULOS RENALES**	CURANDERO	Infusión	Hojas	Té	Curan Deros			Si	mejora		-	Tv	no	Adulto Ancianos
COLA DE CABALLO	**INFLAMACIÒN DE LA VEJIGA, CALCULOS RENALES**	CURANDERO	Decocción	Hojas	Decoc-Ción x Varios Minutos	Curan Deros		Si		mejora	Si	-	-	no	Adultos Ancianos

EUCALIPTO	**TOS**	FAMILIA	Infusiòn	Hojas	Hojas Frescas o secas	Tiendas Merca-Dos		Si		mejora		-	Tv	no	Niños Ancianos
GUAYUSA	**REUMATISMO, DIABETES**	CURANDERO	Infusión	Hojas	Té	Mercado			si	mejora	Si	-	-	no	Adultos ancianos
MANZANILLA	**DOLOR DE ESTOMAGO, ANTIFLAMATORIO, CÒLICOS MESTRUALES**	FAMILIA	Infusión	Flores, tallo, hojas, raìz	Té	Tiendas Merca-Dos	Si			mejora	Si	-	Tv	no	Niños Adultos Ancianos
MIRRA	**DERMATOLOGICO, ANTISEPTICO**	CURANDERO	Aceite esencial	Corteza y resina	Aceite	Mercados	Si			mejora	Si	-	Internet	no	Adultos
OREGANO	**COLICO DE GASES**		Médico	Hojas	Té	Tiendas Merca-Dos	Si			mejora	Si	-	-	no	Niños
PAICO	**ANTIPARASITARIO**	AMIGO	Infusion	Hojas y flores	Té	Tienda mercados	Si			mejora	Si	-	-	no	Niños adultos y ancianos

RUDA	**INFLAMACION**	AMIGO	Infusiòn	Hojas	Tè	Mercados	si			mejora	Si	-	Radio	Se dice abortiva	Adultos
UÑA DE GATO	**INFECCIONES URINARIAS**	AMIGO	Infusión	Tallo	Té	Mercados			si	mejora	Si	-	Tv	No	
SABILA	**CICATRIZANTE, ANTIFLAMATORIO**	FAMILIA	Cruda	Gel	Licuada en jugos Licuar gel puro y aplicar en parte con quemaduras Licuar y poner en el cabello por 20 minuto	Casa Y Merca-Dos		si		mejora	Si	-	Internet	No	Adultos

TORONJIL	**NERVIOS**	FAMILIA	Infusión	Hojas	Té	tiendas mercados	Si			mejora	Si	-	-	No	Adultos ancianos
VALERIANA	**NERVIOS**	AMIGO	Infusión	hojas	Té	Tiendas Merca-Dos			si	mejora	Si	-	-	No	Niños Adultos Ancianos

Realizado por: Autora

Tabla 9. Las personas encuestada mencionaros 16 plantas medicinales de las cuales manifestaron diversas formas de preparación siendo la más utilizada la infusión seguida de cocimiento. La parte mayormente utilizada son las hojas. Casi todas las personas adquieren las plantas medicinales en el mercado ya que en ese lugar pueden encontrar diversidad de especies.

Además gran parte de encuestados indicaron que utilizaron la planta por el lapso de un día. Todos los participantes de la encuesta manifestaron que sintieron mejoría después de utilizar la planta medicinal. Muy pocas personas tienen conocimiento sobre estudios científicos que se hayan realizado a las platas medicinales. La mayoría de las personas encuestadas también dieron a conocer que utilizaron las plantas en niños.

3.2 Estudio microbiológico

En cuanto a la determinación del efecto inhibidor del aceite esencial y del extracto etanólico de *Commiphora myrrha* diluidos al 25%, 50%, 75 % y 100 % sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*, se realizó la técnica de difusión de discos. Se utilizó como control positivo clorhexidina al 2% y como control negativo agua destilada. Para el análisis estadístico de los datos se aplicó ANOVA unifactorial.

Para determinar el intervalo de milímetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano se hizo uso de la escala de Duraffourd herramienta que permite conocer la sensibilidad de la bacteria frente al aceite esencial y extracto etanólico.

- Nula…….... si es inferior a 6 mm
- Sensibilidad límite ……..de 6 - 14 mm
- Sensibilidad media …….de 14 - 20 mm
- Sumamente sensible …….superior a 20 mm

De acuerdo a los resultados obtenidos y utilizando la escala de Duraffourd se realizaron los siguientes análisis representados en las siguientes tablas:

Tabla 10 Promedios de halos de inhibición del aceite esencial de *Commiphora myrrha* frente a *Streptococcus mutans*

HALOS DE INHIBICIÓN (mm)											
DILUCIÓN %	**P1 mm**	**P2 mm**	**P3 mm**	**CONTROL BLANCO**	**CONTROL POSITIVO**	**TOTAL**	**PROMEDIO**	**MÍNIMO**	**MÁXIMO**	**MEDIANA**	**DESVIACIÓN ESTÁNDAR**
25	6	6	5	0	15	17	6	5	6	6	0,58
50	8	7	7	0	15	22	7	7	8	7	0,58
75	9	9	10	0	15	28	9	9	10	9	0,58
100	11	12	12	0	15	35	12	11	12	12	0,58

Realizado por: Autora

Tabla 10. Los halos resultantes obtenidos por los discos impregnados con aceite esencial de *Commiphora myrrha* fueron de 6 mm para el de 25%, 7 mm para el de 50%, 9 mm para el de 75% y 12 mm para el de 100%. Los porcentajes inhibitorios tuvieron los siguientes valores: 40% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 25%; 46,66% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 50%, 60% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 75%; y 80% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 100%

Al realizar un análisis de las frecuencias se determinó que 11 valores se encuentran dentro del rango de 6-14 mm, indicando con esto que el efecto inhibitorio del aceite esencia del *Commiphora myrrha* se encuentra dentro de la "Sensibilidad Límite" de la escala de Duraffourd.

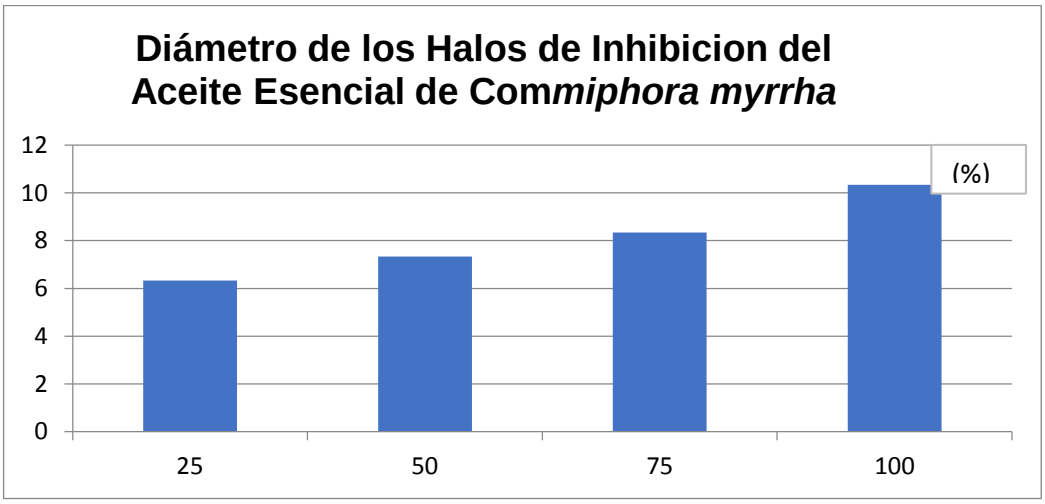
Tabla 11 Frecuencia del promedio de Halos de inhibición del aceite esencial de *Commiphora myrrha*

Diámetro del Halo de Inhibición	Frecuencia	Porcentaje
< 6 mm	1	8,33
6-14 mm	11	91,67
14-20 mm	0	0
> 20 mm	0	0
Total	12	100

Realizado por: Autora

Tabla 11. Presenta las medidas obtenidas conforme la escala Duraffourd. Se evidencia 1 halo de diámetro menor a 6 mm lo que representa el 8,33% y 11 halos de en (mm) 4mm lo que representa el 91,67% de los datos. La sensibilidad del aceite esencial de *Commiphora myrrha* está dentro de sensibilidad límite.

Gráfico 3 Promedio de Diámetro de Halos de Inhibición para el Aceite Esencial al 25%, 50%, 75% y 100% de *Commiphora myrrha* frente a S mutans



Realizado por: Autora

Gráfico 4. Se demuestra que los resultados de los halos se encuentran dentro del rango de 6 -14 mm según escala de Duraffound, esto indica que existe un efecto inhibitorio de Sensibilidad Límite.

Tabla 12 Promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Commiphora myrrha* frente a S. mutans

HALOS DE INHIBICIÓN (mm)											
DILUCIÓN %	**P1 mm**	**P2 mm**	**P3 mm**	**CONTROL BLANCO**	**CONTROL POSITIVO**	**TOTAL**	**PROMEDIO**	**MINIMO**	**MAXIMO**	**MEDIANA**	**DESVIACIÓN ESTÁNDAR**
25	6	6	6	0	15	19	6	6	7	6	0,577
50	6	7	7	0	15	22	7	7	8	7	0,577
75	8	8	9	0	15	25	8	8	9	8	0,577
100	10	10	11	0	15	31	10	10	11	10	0,577

Realizado por: Autora

Tabla 12. Los halos promedio obtenidos por los discos impregnados con el extracto etanólico de *Commiphora myrrha* fueron de 6 mm para el de 25%, 7 mm para el de 50%, 8 mm para el de 75% y 10 mm para el de 100%. Los porcentajes inhibitorios tuvieron los siguientes valores: 40% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 25%; 46,66% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 50%, 53,33% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 75%; y 66,67% de porcentaje inhibitorio corresponde a la dilución al 100%

Al realizar un análisis de las frecuencias hemos encontrado que 12 valores se encuentran dentro del rango de 6-14 mm, indicando con esto que el efecto inhibitorio del extracto etanólico del *Commiphora myrrha* se encuentra dentro de la “Sensibilidad Límite” de la escala de Duraffourd

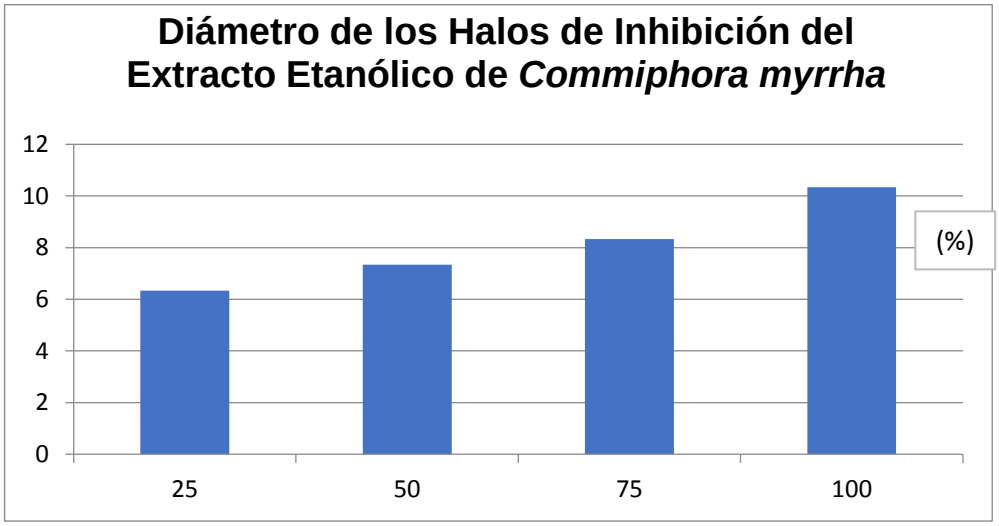
Tabla 13 Frecuencia del promedio de Halos de inhibición del Extracto Etanólico de *Commiphora myrrha* frente a *Streptococcus mutans*

Diámetro del Halo de Inhibición	Frecuencia	Porcentaje
< 6 mm	0	0
6-14 mm	12	100
14-20 mm	0	0
> 20 mm	0	0
Total	12	100

Realizado por: Autora

En la Tabla 13. Se observa que los diámetros de los halos de inhibición se han situado entre los rangos de 6-14 mm con una frecuencia de 12 datos ubicando a la sensibilidad del extracto etanólico dentro de una sensibilidad límite.

Gráfico 4 Promedio de Diámetro de Halos de Inhibición para el extracto etanóli (mm) 25%, 50%, 75% y 100% de *Commiphora myrrha* frente a S. mutans



Realizado por: Autora

3.3.- Análisis estadístico ANOVA

Una vez obtenidos los resultados se realizó la evaluación estadística a través de la prueba ANOVA (Análisis de varianza), donde se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de los halos de inhibición con un alfa de 0.05 y por lo tanto se rechaza la no existencia de actividad antimicrobiana del aceite esencial y del extracto etanólico de la mirra.

Tabla 14 Análisis de varianza del aceite esencial (Halo inhibición (mm)):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	3	60,333	20,111	60,333	**< 0,0001**
Error	8	2,667	0,333		
Total corregido	11	63,000			

Calculado contra el modelo Y=Media(Y)

Tabla 15 Coeficientes estandarizados del aceite esencial (Halo inhibición (mm)):

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > |t|	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
dilucion-0,25	-1,134	0,089	-12,728	**< 0,0001**	-1,339	-0,928
dilucion-0,5	-0,819	0,089	-9,192	**< 0,0001**	-1,024	-0,613
dilucion-0,75	-0,441	0,089	-4,950	**0,001**	-0,646	-0,236
dilucion-1	0,000	0,000				

Gráfico 5 Coeficientes estandarizados del aceite esencial (Halo inhibición (mm))

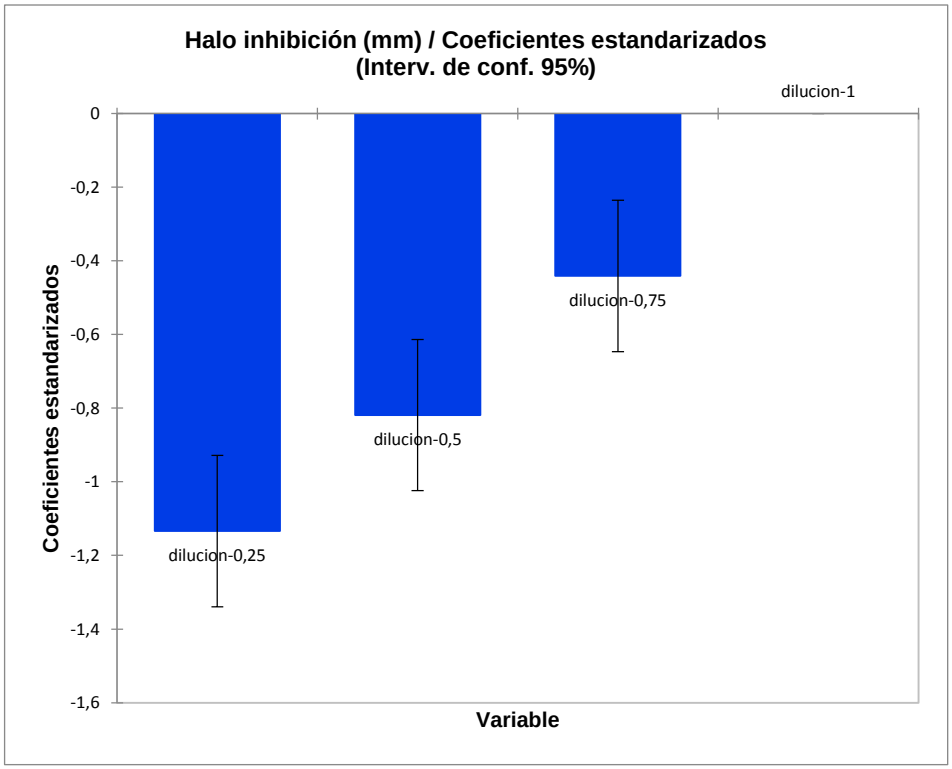


Tabla 16 Medias LS para el factor dilución del aceite esencial

Categoría	Media LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
0,25	5,667	0,333	4,898	6,435
0,5	7,333	0,333	6,565	8,102
0,75	9,333	0,333	8,565	10,102
1	11,667	0,333	10,898	12,435

Gráfico 7. Medias LS para el factor dilución del aceite esencial

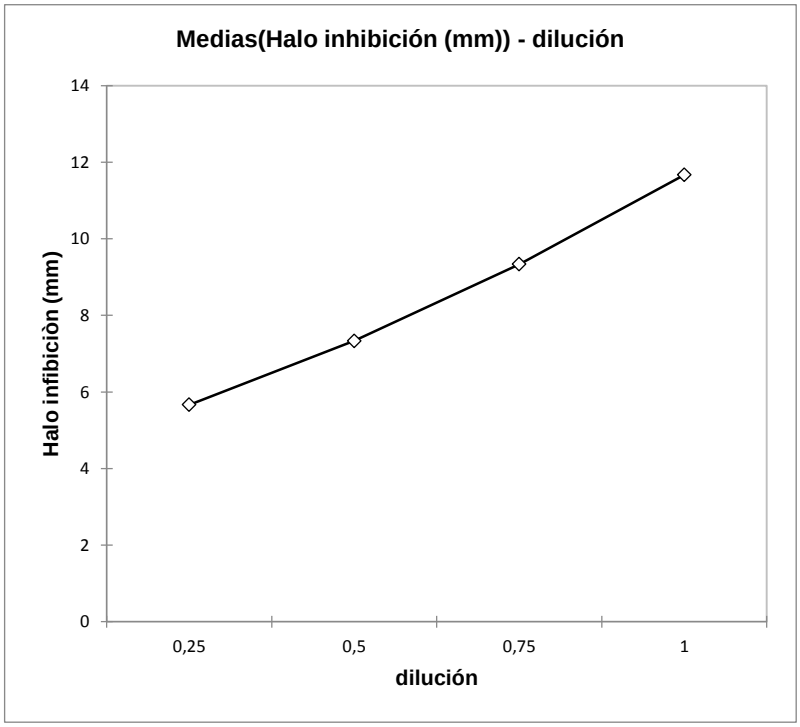


Tabla 17 Análisis de varianza del extracto etanólico (Halo inhibición (mm))

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	3	33,667	11,222	44,889	**< 0,0001**
Error	8	2,000	0,250		
Total corregido	11	35,667			

Calculado contra el modelo Y=Media(Y)

Tabla 18 Coeficientes estandarizados de extracto etanólico (Halo inhibición (mm))

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > |t|	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
dilucion-0,25	-1,088	0,103	-10,614	**< 0,0001**	-1,325	-0,852
dilucion-0,5	-0,921	0,103	-8,981	**< 0,0001**	-1,157	-0,684
dilucion-0,75	-0,502	0,103	-4,899	**0,001**	-0,739	-0,266
dilucion-1	0,000	0,000				

Gráfico 6 Coeficientes estandarizados de extracto etanólico (Halo inhibición (mm))

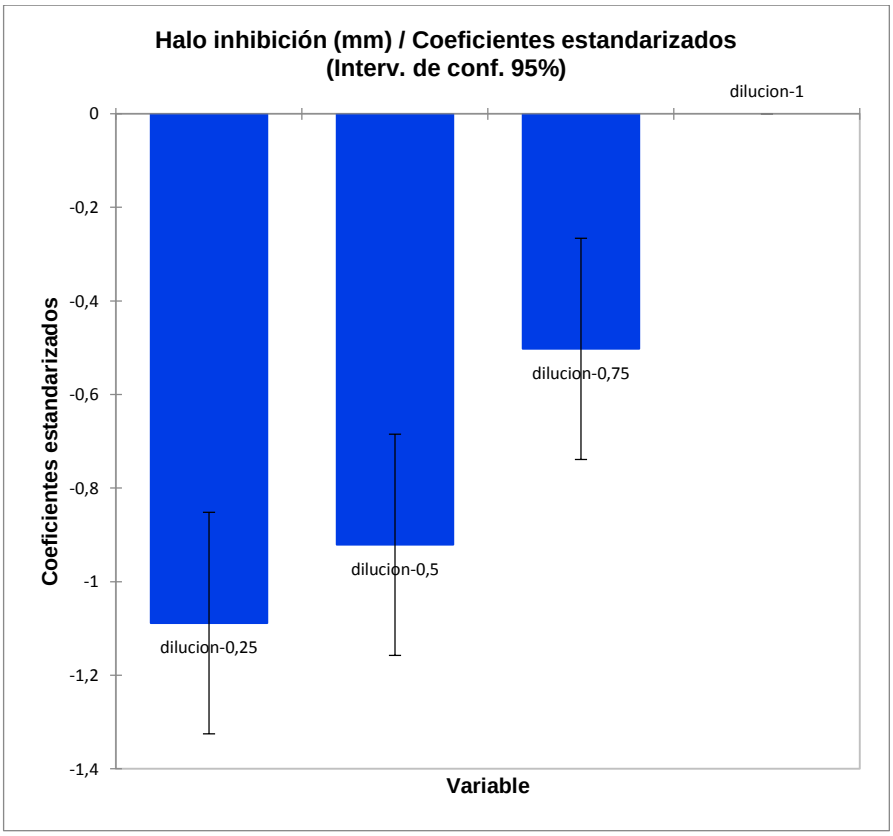
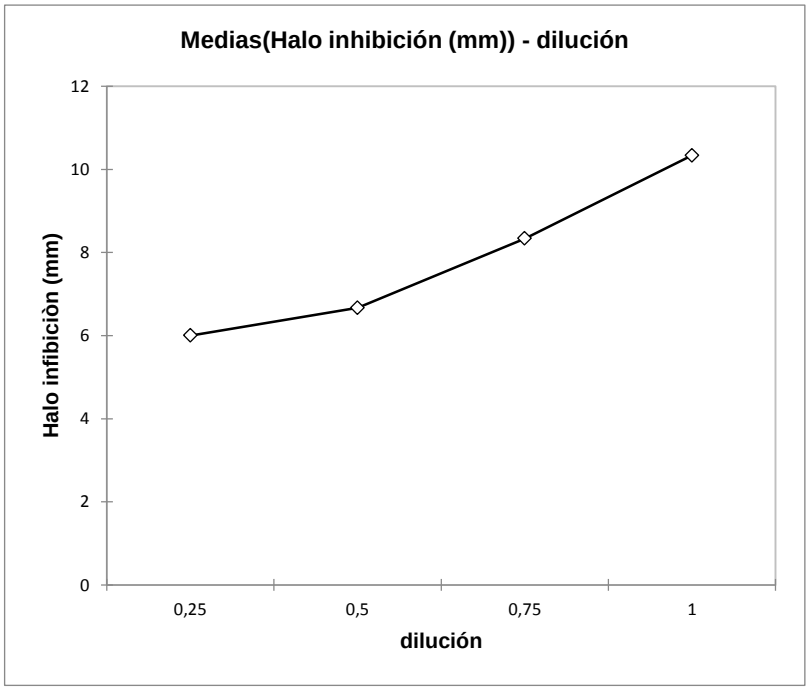


Tabla 19 Medias LS para el factor dilución de extracto etanólico

Categoría	Media LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
0,25	6,000	0,289	5,334	6,666
0,5	6,667	0,289	6,001	7,332
0,75	8,333	0,289	7,668	8,999
1	10,333	0,289	9,668	10,999

Gráfico 7 Medias LS para el factor dilución de extracto etanólico



3.4 Conclusiones parciales

- A través del estudio etnofarmacológico se determinó el índice de valor de uso de la *Commiphora myrrha* siendo de 0,022; y, el nivel de uso significativo el cual fue de 20% por lo que es considerada aceptable desde el punto de vista cultural.
- Por medio del estudio etnofarmacológico se evidenció que la población no conoce a cerca de las propiedades antimicrobianas que posee la mirra.
- En el estudio microbiológico del aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha* en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre Streptococcus mutans se evidenció un espectro amplio de actividad al 100%, con un promedio de halo de inhibición de 12 mm en el aceite esencial y 10 mm en el extracto etanólico.
- Se evidenció que el aceite esencial mostró mayor efecto antimicrobiano que el extracto etanólico sobre *Streptococcus mutans* de acuerdo a la escala de Duraffourd, el resultado los ubica en sensibilidad limite.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los parámetros físico-químicos del aceite esencial de *Commiphora myrrha* indican que está compuesto por α -elemene (12.86%), 7-isopropil-1,4-dimetil-2-azulenol (12.22%), curzereno (11.64%), y germacra-1 (10) 7,11-trien-15-oicacid, 8,12-epoxi-6-hidroxi-c¸-lactona (6,20%) y en el extracto etanólico se presentan polisacáridos, aminoácidos y flavonas, un tipo de polifenoles.
- La determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial sobre Streptococcus mutans en la dilución de la mínima concentración 25% obtuvo un promedio de halo de inhibición de 6 mm; al 50% de 7 mm; al 75% de 9 mm y al 100% de 12 mm. Las mediciones de los halos de inhibición fueron validadas en la escala de Duraffound donde evidencia una Sensibilidad Límite.
- La determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico sobre *Streptococcus mutans* arrojó valores de promedios de halos de inhibición levemente menores en comparación a los del aceite esencial, en la dilución al 25% el promedio fue de 6 mm; al 50% de 7mm; al 75% fue 8 mm y al100% de 10 mm. Presentando Sensibilidad Límite de acuerdo a la escala de Duraffourd.
- A medida que aumenta la concentración de aceite esencial y extracto etanólico aumenta su efecto inhibitorio.
- Mediante el análisis estadístico ANOVA se determinó que existen diferencias significativas entre los valores promedio de los halos de inhibición, con un valor de P= <0.0001 para el aceite esencial y el extracto etanólico, por lo tanto se rechaza la no existencia de actividad antimicrobiana.
-

RECOMENDACIONES

1. El aceite esencial de mirra presenta una Sensibilidad Límite por lo que amerita realizar un tamizaje fotoquímico para determinar la presencia de cada molécula presente.
2. Se puede preparar extractos acuosos, metanólicos, etanólico, en hexano y cloroformo y evaluar la actividad antimicrobiana con la misma bacteria.
3. Con los resultados obtenidos se puede realizar el diseño y desarrollo de una formulación viable de fitofármaco bucal efectivo contra la placa dental.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Estrategia de la OMS Sobre la Medicina Tradicional 2014-2013..

2. Juanpch. Lista de Plantas Medicinales del Ecuador (y para que sirven). 2017..

3. Acuña L G. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. Rev Chil Infect. 2003; 20(Supl. 1): p. 7-10.

4. Sanchez-Uribe M. Cronobiología y Farmacología: Cronofarmacología. Revista de Actualizaciones en Enfermería. 2002; 71(1).

5. Rocha Hernández J. Antimicrobianos. Rev Finlay. 1989; 3(1): p. 1-14.

6. S R. The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils--a combination from the pharaonic pharmacopoeia. 2012..

7. DA T. Effect of myrrh oil on IL-1beta stimulation of NF-kappaB activation and PGE(2) production in human gingival fibroblasts and epithelial cells. 2006..

8. Fabio F. Utilización sustancias naturales en Odontología. 2004.

9. Mohamed A., Ali S., El.Baz F., Hegazy A. and Kord M. Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant andantimicrobial activities of crude extracts of Commiphora myrrha resin. Revista Industrial Crops and Products [Internet]. 2014. [citado 2018 marzo 15]; Disponible en https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014001514

10. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2025. [Internet]; 2013 [citado 2018 mayo 22]. Disponible en: http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js2299s/

11 Krzyściak V, Pluskwa K., Piątkowski J, et al. The usefulness of biotyping in the
. determination of selected pathogenicity determinants in Streptococcus mutans. Revista BMC Microbiology. [Internet]. 2014 [citado 2018 mayo 22]; 1. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096795

12 Rates S. Plants as source of drugs. Toxicon. 2001; 39(5): p. 603-613.
.

13 Elisabetsky E. Etnofarmacología. Ciência e Cultura. 2003; 55(3): p. 35-36.
.

14 Tomás Z. Veinte Plantas Medicinales Bajo Lupa. 2004..
.

15 Guanoluisa H. Efecto antimicorbiano del extracto, aceite esencial del jengibre
. sobre cepas de enterococcus faecalis. Odontología. 2017.

16 Garode W. Antibacterial Activity of guava leaves extraxts against S. mutans.
. Internacional Journal of Bioassays. 2014;: p. 3-15.

17 Centro de Estudios e Investigaciones Estadísticas ICM-ESPOL. Disponible en: http://www.uap.edu.pe/Investigaciones/Esp/Revista_14_Esp_07.pdf
.

18 Fathilah A, Razar Z. The anti-adherence effect of Piper betle and Psidium
. guajava extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces. Journal of Oral Science. 2003; 4(45): p. 38-42.

19 Carlos OJ. Streptococcus Mutans y Caries Dental. 2013..
.

20 JV P. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcóolico da Punica Granatum

. Linn sobre microrganismos formadores da placa bacteriana. 1998..

21 Eliminación de Cándida albicans con Extracto Etanólico de Propóleo comercial
. de apis mellifera del estado Mérida, en bases de prótesis parciales removibles. Revista Odontologica de los Andes. 2014 Ene; 5(7): p. 4-14.

22 KUKLEVA K. A STUDY ON THE PREVALENCE OF CARIES INCIPIENS IN 7-
. ,12 AN 14 YEARS OLD CHILDREN FROM. FOLIA MED. 1998.

23 Tillotson AK. The One Earth Herbal Sourcebook: Everything You Need to
. Know About Chinese, Western, and Ayurvedic Herbal Treatments: Twin Streams; 2001.

24 A C. The Encyclopedia of Medicinal Plants London: Dorling Kindersley; 1196.
.

25 D B. Encyclopaedia of Herbs and their Uses London: Dorling Kindersley; 1995.
.

26 Various. World Agroforesty Centre. [Online]. Available from:
. http://www.worldagroforestry.org/

27 S F. Cornucopia II: Kampong Publications; 1998.
.

28 E. S. H. El Ashry NROMSAS. Components, therapeutic value and uses of
. myrrh. Pharmazie. 2003 Octubre; 58.

29 Hanuša LO. MYRRH – COMMIPHORA CHEMISTRY. Biomed. Papers. 2009;
. 149(1).

30 Various. Herbal Resource. [Online].; 2015 [cited 2018 03 07. Available from:
. https://www.herbal-supplement-resource.com/myrrh-gum-herb.html

31 SANCHEZ STVRMCMCM. FITOQUÍMICA DE CINCO ESPECIES DEL
. GÉNERO BACCHARIS (B. boyacensis. BOGOTA:; 2010.

32 Michael T. Madigan KSBDHBWMSDAS. Brock Biology of Microorganisms:
. Pearson Education; 2017.

33 RS G. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of
. evolutionary relationships among archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. Microbiology and molecular biology reviews. 1998 Diciembre; 62(4).

34 Gupt RS. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection
. pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. Antonie van Leeuwenhoek. 2011 Junio; 100(2).

35 Linda Cavaletti PMRBPSMRMSaSD. New Lineage of Filamentous, Spore-
. Forming, Gram-Positive Bacteria from Soil. Applied and environmental microbiology. 2006 Junio; 72(6).

36 Mhairi G. MacDonald MMKSMDM. Avery's Neonatology: Pathophysiology &
. Management of the Newborn Filadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

37 Johnston C, Martin B, Fichant G, Patrice Polard JPC. Bacterial transformation:
. distribution, shared mechanisms and divergent control. Nature Reviews Microbiology. 2014; 12.

38 Lisa S. The Role of Streptococcus mutans And Oral Ecology in the Formation
. of Dental Caries. Journal of Young Investigators. 2007 Diciembre.

39 Juan Carlos Ojeda-Garcés EOGLAS. Streptococcus mutans y caries dental.
. CES ODONTOLOGIA. 2013 Jan/June; 26(1).

40 Zachary D. Moye LZRAB. Fueling the caries process: carbohydrate
. metabolism. Journal of Oral Microbiology. 2014 Septiembre.

41 Wisconsin Uo. Bioweb. [Online].; 2007 [cited 2018 02 27. Available from:
. http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/allmann_ambe/life_history_reproduction.
htm

42 COYKENDALL AL. Four Types of Streptococcus mutans Based on Their
. Genetic. Journal of General Microbiology. 1974 March; 83.

43 Guillaume G. Nicolas MCL. Streptococcus mutans et les streptocoques
. buccaux dans la plaque dentaire. 2011; 57(1).

44 Montes de Oca Ch. MdlA. Placa bacteriana. Revista costarricense de ciencias
. médicas. 1989; 10(1).

45 Streptococcus mutans y caries dental en América Latina. Revisión sistemática
. de la literatura. Revista Nacional de Odontología. 2012 Marzo; 8(14).

46 Prada J. Analisis Metaboloico De Baccharis Latifolia. Nueva Granada:; 2015.
.

47 Martinez M. Ausencia de Actividad Antimicrobiana de un Extracto Acuoso
. Liofilizado de Aloe Vera. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1996
Septiembre-Diciembre; 1(3).

48 C. Duraffourd JCLLdH. Cuadernos de fitoterapia clínica: Masson; 1987.

ANEXOS

ANEXO 1: Certificación botànica de *Commiphora myrrha*

Herbario GUAY
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad de Guayaquil

De: Msc. Xavier Cornejo, curador asociado
Para: Dra. Carmen Bonifaz, Decana Fact. CCNN y Directora de Herbario GUAY
Fecha: Jueves, 8 de marzo de 2018
Asunto: Identificación de 1 espécimen y descripción.
Registro GUAY de Identificación: 75

Saludos Cordiales. Por medio de la presente se entrega la identificación y descripción de 1 espécimen de planta vascular, recibido en el Herbario GUAY el 7 de marzo de 2018

Atentamente,

MSc. Xavier Cornejo
Curador
Herbario GUAY

Adj.: Identificación
cc: Herbario GUAY

1

Av. Juan Tanca Marengo y Av. Gómez Lince s.n.
P.O. Box 09-01-10634
Guayaquil-Ecuador

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Superorden: Sapindales

Orden: Sapindales

Familia: Burseraceae

Género: *Commiphora*

Nombre científico: ***Commiphora myrrha***

Nombre vernáculo: Mirra

Descripción taxonómica:

"Commiphora myrrha" es un arbusto o árbol pequeño con hojas verdes y dos foliolos laterales. Después de la época de lluvias se le hace una incisión en el tronco, que exuda una resina gomosa, amarga y aromática de color amarillo que al secarse tiene formas irregulares y tonalidad pardo-rojiza.

Av. Juan Tanca Marengo y Av. Gómez Lince s.n.
P.O. Box 09-01-10634
Guayaquil-Ecuador

ANEXO 2: Cepa *Streptococcus mutans*

ANEXO 3: Aceite esencial *Commiphora myrrha*

ANEXO 4: Extracto etanòlico *Commiphora myrrha*

ANEXO 5: Siembra de la bacteria *Streptococcus mutans* en agar Mueller Hinton

ANEXO 6: Siembra de la bacteria *Streptococcus mutans* en agar sangre

ANEXO 7: Crecimiento bacteriano y formación de halos de inhibición con aceite esencial y extracto etanólico de *Commiphora myrrha*

ANEXO 8: Medición de halos de inhibición

Anexo 9:

CUESTIONARIO ETNOFARMACOLÒGICO

La Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES), se encuentra desarrollando un proceso de investigación sobre el uso tradicional de las plantas medicinales por la población ecuatoriana, es por ello que, teniendo en cuenta la experiencia acumulada por usted al respecto le solicitamos su valiosa cooperación, la cual se materializará llenando el siguiente cuestionario.

1.- ¿Conoce Ud. alguna(s) planta(s) utilizada(s) con fines medicinales?

Si: __ No:__ ¿Cuáles? _____, _____, _____

_____, _____, _____,

_____,

3.- ¿La(s) ha utilizado Ud. alguna vez? ¿Para qué? (Indicación) Si: __ No: __

Nombre de la Planta	Indicación o Uso
a)	a)
b)	b)
c)	c)
d)	d)

4.- ¿Quién se la indicó o le sugirió su uso?

a) Médico___ b) Curandero ___ c) Familiares ___ d) Vecinos o amigos ___

5-¿En qué forma la ha utilizado? (Modo de uso)

a) ___Infusión b) ___Cocimiento c) ___Planta cruda d)

___Otra forma ¿Cuál? _____

6.- ¿Cómo la preparó? (Describa el modo de preparación del remedio especificando la parte de la planta empleada: *hojas, tallo, raíces, flores, frutos.*

_____

_____

_____

7.- ¿Dónde encuentra Ud las plantas?

a) ___ El patio b) ___ Fuera de la casa c) ___ Las compra.

¿Dispone de un ejemplar a su alcance? Si: ___ No ___ (**Recolectar muestra**).

8.- ¿Durante qué tiempo la utilizó? (Duración del tratamiento)

a) ___ Un día b) ___ Menos de una semana c) ___ Más de una semana

d) ___ Un mes e) ___ Varios meses f) ___ Un año g) ___ Más de un año

9.- ¿Qué resultados obtuvo con su empleo?

a) ___ Mejoró b) ___ No mejoró c) ____ Empeoró

10.- ¿La ha consumido sola o conjuntamente con otras sustancias? En el caso de que la haya consumido con otras sustancias responda:

Con medicamentos ¿cuáles? _____, _____,

_____

Con otras plantas medicinales ¿cuáles? _____, _____, _____

11.- ¿Conoce Ud si esa planta se ha estudiado científicamente? Si: __ No: __

¿Por qué vía le llegó la información de dicho(s) estudios (s)?

a) ___La radio b) ___T.V c) ___ Libros, revista, periódico d) ___ Internet

12.- ¿Conoce alguna precaución que debe tomarse durante el tratamiento? (Contraindicaciones) Si: ___ No: ___ ¿Cuál (s)?_____, _____, _____

13.- En qué personas las ha usado:

En niños: ___

En adultos: ___

En ancianos: ___

OBSERVACIONES:

GRACIAS