

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

**“EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL *CITRUS BERGAMIA*”
BERGAMOTA” SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS ATTC 25175*”**

AUTOR: KATHERINE GIOHANA CAMPOS LAYZA

ASESORA: MARIA VICTORIA ESPINOZA SALCEDO

Trujillo – Perú

2020

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y la oportunidad de poder ir cumpliendo mis metas según su disposición, por darme fuerza y sabiduría para no rendirme en el camino y por darme el regalo de tener una gran familia, que hoy en día se han convertido en mi motor y motivo.

A mis padres, Flor y Felipe, quienes me formaron con valores y grandes sueños y que en mis caídas estuvieron apoyándome siempre. **A mis hermanas**, Cynthia y Kessly, que siempre estuvieron dispuestas apoyarme en lo que necesitaba.

A mi esposo y en especial a mi hijo, Mateo, que vino para hacerme conocer el amor incondicional, y ser mi motor y motivo para cumplir cada meta durante mi camino profesional y ser la mejor por él y para él.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios en primer lugar, por brindarme a mí y a mi familia la vida y salud, para poder concluir satisfactoriamente mi etapa de pregrado.

A mis padres, Flor y Felipe, por brindarme un hogar lleno de sabiduría, valores y amor, que gracias a su trabajo lograron sacarnos adelante a mis hermanas y a mí, convirtiéndonos en mujeres de bien. A mis hermanas, Cynthia y Kessly, que más que hermanas son mis amigas, estuvieron siempre apoyándome en todo momento durante mi vida universitaria.

A mi esposo, Jimmy, quien me apoyo desde el colegio, brindándome todo lo que pudo a su alcance para no desvanecer durante cada clínica.

Agradezco de manera muy especial a mi asesora, la Dra. María Espinoza Salcedo, por su tiempo, apoyo y por guiarme durante la elaboración de este proyecto.

A los docentes y autoridades de esta prestigiosa casa de estudios, por formarme profesionalmente con conocimientos y valores de calidad, y de manera muy especial, al Dr. Alfredo Portocarrero Reyes, por sus enseñanzas y consejos para ser una mejor persona y profesional.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la concentración del efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Material y método: El presente estudio longitudinal, comparativo, se realizó mediante el método de difusión en pozos en agar sangre para evaluar la sensibilidad bacteriana del aceite esencial. Se obtuvieron aceites esenciales de *Citrus bergamia* “bergamota” de la empresa de aromaterapia Ekala, a una concentración del 100%, en el laboratorio realizamos las diluciones del aceite esencial al 25%, 50%, 75%. Así mismo se consiguió la cepa de *Streptococcus mutans* ATTC 25175 del laboratorio GenLab del Perú SAC; donde cada cepa se cultivó en placas Petri en agar sangre y se realizaron pocitos de 5mm de diámetro llenos de aceite esencial de bergamota en las diferentes concentraciones y con el Gluconato de clorhexidina al 0.12% como grupo control. Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas, para luego realizar la medición del diámetro del halo de inhibición. Para la confiabilidad de este estudio, se utilizó el método estadístico de ANOVA.

Resultados: El *Streptococcus mutans* ATTC 25175 fue susceptible a la acción del aceite esencial de *Citrus bergamia* “bergamota” a las concentraciones de 50%, 75% y 100%.

Conclusiones: Se concluye que el mayor promedio fue del *Citrus bergamia* “Bergamota” al 100% siendo sumamente sensible.

Palabras claves: Efecto antibacteriano, aceite esencial, *Citrus bergamia*, *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

ABSTRAC

Objective: To determine the concentration of the in vitro antibacterial effect of *Citrus bergamia* "bergamot" against *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Material and method: The present longitudinal, comparative study was performed using the diffusion method in blood agar wells to assess the bacterial sensitivity of the essential oil. *Citrus bergamia* "bergamot" essential oils were obtained from the aromatherapy company Ekala, at a concentration of 100%, in the laboratory we carried out dilutions of the essential oil at 25%, 50%, 75% and 100%. Also, the *Streptococcus mutans* ATTC 25175 strain was obtained from the GenLab laboratory in Peru SAC; where each strain was grown in Petri dishes on blood agar and 5mm diameter wells filled with bergamot essential oil were made at a concentration of 100%, 75%, 50% and 25% each.

This oil was compared with 0.12% chlorhexidine gluconate as a control group. Subsequently, they were incubated at 37 ° C for 24 hours, to then measure the diameter of the inhibition halo. For the reliability of this study, the Kappa statistical method was used. For the analysis of results, the statistical program SPAA version 23 and Excel were used, to then present the results in tables and graphs.

Results: *Streptococcus mutans* ATTC 25175 was susceptible to the action of *Citrus bergamia* "bergamot" essential oil at concentrations of 50%, 75% and 100%.

Conclusions: It is concluded that the highest average was 100% *Citrus bergamia* "Bergamot" being highly sensitive.

Key words: Antibacterial effect, essential oil, *Citrus bergamia*, *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
II.	METODOLOGÍA.....	14
III.	RESULTADOS.....	22
IV.	DISCUSIÓN.....	29
V.	CONCLUSIONES.....	31
VI.	RECOMENDACIONES.....	32
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	33
VIII.	ANEXOS.....	37

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

La caries dental hoy en día es catalogada como una enfermedad con mayor número de incidencias que afecta al 90% de la población a nivel mundial. A lo largo de la historia es de conocimiento de los profesionales de la salud bucal que la caries dental es el resultado de diferentes factores que tienen que participar simultáneamente alterando la homeostasis microbiana oral para que esta tenga protagonismo en boca.

La desmineralización y la re mineralización son parte de un proceso dinámico, este proceso es lo que conlleva a la caries dental, esto es resultado del metabolismo bacteriano sobre el área dentaria, este proceso con el tiempo conlleva a una pérdida irreparable de minerales dentales, que si no son tratados a su tiempo pueden terminar con presencia de una cavidad en el diente que puede afectar al esmalte, dentina y hasta la pulpa dental si no es tratada.¹ Los microorganismos orales, especialmente las bacterias son parte de una colectividad extensa de especies que son parte de la conformación de la placa bacteriana. Actualmente la definición de esta enfermedad abarca que numerosos microorganismos conforman la patogénesis de la caries dental, entre ellos tenemos principalmente al *Streptococcus Mutans* que es el que tiene mayor participación; también tenemos al *Lactobacillus spp* y al *Actinomyces spp*. La aglomeración bacteriana que conforman la biopelícula que es formada de manera natural en la cavidad oral, puede llegar a un desequilibrio produciendo no solo la caries dental, sino también la periodontitis.¹

Una biopelícula libre de patologías puede llegar a tener aproximado alrededor de 700 especies bacterianas, de entre ellas tiene un porcentaje menor del 1% que son potencialmente patogénicas; esto afecta ya que una biopelícula sana tiene la función de actuar como una defensa de primera línea ante posibles infecciones que puede llegar a afectar a la boca debido a bacterias patogénicas u otras enfermedades provocadas por otros patógenos. Cuando existen cambios que

afecta el equilibrio de la biopelícula entonces se favorece al desarrollo de especies que son patogénicas tanto acidúricas como acidogénicas y tomen el papel de la misma.²

El desarrollo en biopelículas da los medios óptimos para el correcto funcionamiento del mecanismo de demarcación entre las células estreptocócicas para que el intercambio genético sea más llevadero es decir más fácil y así poder generar factores que tengan la propiedad de ser virulentos. Las poblaciones que tienen la capacidad de formar biopelículas tienen la capacidad de llegar a alcanzar a perjudicar diversas áreas del cuerpo humano fuera de lo que es la cavidad oral tal como es el caso como en la piel que puede llegar a provocar lesiones infecciones, a nivel del aparato respiratorio puede llegar a afectar a los pasajes terminales de aire y a los senos paranasales, a nivel ortopédico puede afectar a aparatos prostéticos y a nivel cardiológico puede llegar a afectar a las válvulas cardiacas; es por ello que es bueno conocer acerca de su comportamiento de estos microorganismos fuera de la cavidad oral.³⁻⁵

Los múltiples métodos y a la vez técnicas que existen hoy en día que se pueden poner en práctica tanto para el estudio y análisis de estas especies relacionadas con el presente estudio nos permiten darle la relación adecuada con respecto a la caries dental y enfermedad periodontal. Es necesario poder estudiarlas aun comprendiendo sus ventajas y desventajas para llegar a tener la mayor información posible para beneficio de la población tanto como para el paciente. Es por eso que en el presente estudio se analiza el comportamiento específicamente de la bacteria del *Streptococcus Mutans* frente a un agente antibacteriano mediante técnicas usadas gracias a la microbiología usando el aislamiento, clasificación y el estudio a cabalidad de este misma empleando la susceptibilidad de inhibición como indicador para lograr resultados que ofrezcan una mejora en cuento a la relación con la caries dental.⁶

1.2. MARCO TEÓRICO

La bacteria *Streptococcus mutans* que conforma la flora bacteriana tanto de la cavidad oral como de las vías respiratorias altas se encuentra dentro de la familia de los cocos Gram positivos, anaerobios facultativos.² El *Streptococcus mutans* presenta los siguientes principio de patogenicidad como lo es la producción de bacteriocinas que presentan actividad sobre diversos microorganismos, presentan una capacidad adhesiva sobre las proteínas salivales, síntesis de los polisacáridos extracelulares del grupo glucanos insolubles junto con los solubles, asimismo presenta síntesis de polisacáridos intracelulares.⁸

Actualmente existen muchos métodos para prevenir y tratar este problema de salud dental, generalmente estos métodos consisten en utilizar productos antimicrobianos químicos, estos productos químicos a largo plazo generan daños en el organismo ya que su uso prolongado causa resistencia bacteriana e inmunodepresión. Por otro lado, este problema de salud genera problemas en la economía ya que requiere de una inversión personal, gasto de tiempo para acudir a un profesional Odontólogo dejando de lado otros quehaceres como el estudio, trabajo, oficios en el hogar, etc.⁹

En nuestra actualidad los estudios con distintas plantas vienen generando una expectativa diferente ya que se ha regresado a usar plantas como antiguamente nuestros antepasados lo venían haciendo, para combatir diferentes microorganismos patógenos y están siendo recibidos con mucha atención por los científicos, comprobándose diversas propiedades curativas.¹⁰

En concordancia con la organización mundial de salud (OMS), se dice que toda planta que tenga propiedades y/o sustancias que pueden ser utilizadas en el campo médico con diversos fines terapéuticos o que son antecesores de nuevos medicamentos o drogas semi sintéticas se les denominen como planta medicinal, siendo el mejor origen natural de obtener diversos medicamentos.¹¹

Bergamota es la denominación común de *Citrus bergamia* Risso et Poiteau, una planta perteneciente a la familia *Rutaceae* (subfamilia Esperidea). Los árboles

muestran grandes hojas ovadas de color verde oscuro similares a las del limón, flores blancas en forma de estrella y frutos redondos de color amarillo. Los orígenes botánicos y geográficos de esta planta aún son inciertos¹², puede ser originario de la región de Calabria (Italia), como resultado de mutaciones de otras especies.¹²

El *Citrus bergamia* es un fruto definido como un híbrido entre una naranja agria (*C. aurantium* L.) y un limón (*C. limon* L. burm. F.) O una mutación de este último. Otros autores lo consideraron como un híbrido entre una lima (*C. aurantifolia* Swingle), junto con una naranja agria.¹² La fruta de bergamota se utiliza principalmente por sus aceites esenciales que se obtienen raspando y presionando en frío la cáscara de la fruta. El aceite esencial de bergamota es ampliamente utilizado en las industrias de perfumes, cosméticos, alimentos y confitería por su intensa fragancia y frescura¹². El aceite esencial de bergamota es un aceite volátil de color amarillo verdoso o amarronado (que corresponde al comienzo y al final de la temporada productiva) con un sabor amargo aromático y un olor agradable característico¹³. Se incluye en las farmacopeas oficiales de varios países. Sin embargo, el jugo de bergamota, obtenido del endocarpio después de la extracción de aceites esenciales, se ha considerado durante mucho tiempo solo un producto secundario y desechado de la industria de aceites esenciales debido a su sabor amargo. Recientemente, llamó la atención debido a su actividad hipoglucemiante¹⁴, propiedades antiinflamatorias^{15, 16}, cancerígenas^{17,18}.

Hoy en día en la fabricación de perfumes, el componente principal en la elaboración de estos es el aceite esencial de bergamota debido a su gran capacidad de poder fijar el componente aromático, el aroma, y así poder armonizar en totalidad las esencias, obteniendo una fragancia de nivel. El aceite esencial de bergamota asimismo cumple un papel en la industria farmacéutica, ya que es utilizado para sintetizar los aromas desagradables que presentan algunos medicamentos debido a sus propiedades antibacterianas, así como antisépticas¹⁹.

Vlad y col.²⁰ (2019) Estudiaron la posibilidad de usar aceites esenciales para la inhibición del desarrollo de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) en la cavidad oral,

como una alternativa viable a los productos químicos con Papel protector en la salud bucal. Para este propósito, cuatro aceites esenciales (canela, clavo, bergamota y naranja) se caracterizaron químicamente por cromatografía de gases junto con espectrometría de masas (GC-MS) y se probaron *in vitro* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los resultados que se obtuvieron revelaron el efecto antibacteriano en el *Streptococcus mutans* ejercido por los aceites esenciales de clavo, bergamota y naranja, que se incluyeron en la producción de preparaciones de tipo emulsión natural con aplicación en medicina dental. Las pruebas de saliva demostraron el efecto sinérgico ejercido por los componentes activos que presentan los aceites esenciales probadas a partir de emulsiones terciarias, que causan una inhibición del desarrollo de *S. mutans* en las cavidades orales.

Verma y col.²¹ (2016) Estudiaron tanto la actividad antibacteriana, así como la composición química del aceite esencial primario y el aceite esencial secundario quienes derivan de la destilación al vapor y la destilación hidráulica de la bergamota. Se investigaron utilizando el método de cromatografía de gases detector de ionización de llama, espectrometría de masas, ensayo de difusión de disco y ensayo de caldo de micro dilución. Los aceites aislados de hierbas y destilados acuosos utilizando diferentes métodos mostraron variaciones sustanciales en su composición y perfil de actividad antibacteriana.

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* "bergamota" sobre el *Streptococcus mutans* ATTC 25175?

1.4. HIPÓTESIS:

- El aceite esencial de *Citrus bergamia* "bergamota" inhibe el crecimiento bacteriano *in vitro* del *Streptococcus mutans* ATTC 25175

1.5. OBJETIVOS:

1.5.1. Objetivo General:

- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” a diversas concentraciones frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

1.5.2. Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” al 100% frente a *Streptococcus mutans* ATTC 25175.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” al 75% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” al 50% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” al 25% frente a *Streptococcus mutans* ATTC 25175.
- Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175 con el grupo control de Gluconato de clorhexidina al 0.12%

1.6. VARIABLES

Variable		Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable		Escala de Medición
				Naturaleza	Función	
AGENTE ANTIBACTERIANO	CITRUS BERGAMIA	Bergamota es el nombre común de <i>Citrus bergamia</i> Risso, una planta perteneciente a la familia Rutaceae (subfamilia Esperidea). ¹⁰ Posee propiedades hipoglucemiante ¹² , propiedades antiinflamatorias ¹³ , ¹⁴ , cancerígenas ^{15.16} , antisépticas y antibacterianas ¹⁷ .	Aceite esencial de bergamota obtenido por prensado en frío .25% .50% .75% .100%	Cualitativa	Independiente	Nominal
	GLUCONATO DE CLORHEXIDINA	Agente químico estándar de control de placa, con amplia actividad bacteriana, muy baja toxicidad y fuerte afinidad por el	0.12% será utilizado como grupo control.	Cualitativa	Independiente	Nominal

		tejido epitelial y las membranas mucosas. ¹⁸				
Efecto antibacteriano ante el <i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	Capacidad que un agente presenta para eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrollan en un medio dado ⁴ .	Se medirá según la susceptibilidad de los halos de inhibición mediante la escala de Duraffourd diámetro mm.	Cuantitativa	Dependiente	Razón	

II. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación:

Según el período en que se capta la información	Según la evolución del fenómeno estudiado	Según la comparación de poblaciones	Según la interferencia del investigador en el estudio	Según la recolección de datos
PROSPECTIVO	LONGITUDINAL	COMPARATIVO	EXPERIMENTAL	PROLECTIVO

2.2. Área de estudio:

El presente estudio se desarrolló en los ambientes del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.3. Definición de la población muestral:

- La población estuvo constituida por pocillos, 4 en cada placa Petri inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans* ATTC 25175

2.3.1. Características generales:

2.3.1.1. Criterios de inclusión:

- Cepa de *Streptococcus mutans* ATTC 25175
- Aceite esencial de *Citrus bergamia* "bergamota" al 100%, 75%, 50% y 25%.
- Placas Petri con medio en agar Mueller Hinton con sangre inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans* ATTC 25175, gluconato de clorhexidina y aceites esenciales de *Citrus bergamia* a la concentración correspondiente.

2.3.1.2. Criterios de eliminación:

- Placas petri con medio en agar Mueller Hinton con sangre contaminadas, fracturadas, o algún tipo de daño durante el proceso de incubación y que posteriormente impidan medir de manera correcta la muestra.

2.3.2. Diseño estadístico de muestreo:

2.3.2.1. Unidad de Análisis:

- La unidad de análisis estuvo constituida por cada pozo en cada placa Petri conteniendo siembras de *Streptococcus mutans* ATTC 25175 y los respectivos agentes antibacterianos por grupo: el aceite esencial de *Citrus bergamia* “bergamota” al 100%, y Gluconato de clorhexidina al 0.12% como grupo control.

2.3.2.2. Unidad de muestreo:

- La unidad de muestreo estuvo constituida por cada una de los pozos en cada placa Petri conteniendo siembras de *Streptococcus mutans* ATTC 25175 y los respectivos de agentes antibacterianos por grupo: el aceite esencial de *Citrus bergamia* “bergamota” al 100%, 75%, 50% y 25% y Gluconato de clorhexidina al 0.12% como grupo control.

2.3.2.3. Tamaño muestral:

Para calcular el tamaño de la muestra, se hizo uso de un estudio previo²¹, el cuál estudió a la bergamota y al clavo de olor frente al *Streptococcus mutans*; se empleó la siguiente fórmula para la comparación de medias:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Dónde:

n= número de pacientes

Z α = Riesgo de 0.05= 1.645

Z β = Poder estadístico de 80%= 0.842

$S^2 =$ Valor del grupo de referencia = $(0.3)^2$

$d^2 =$ Valor mínimo de diferencia = $(0.31)^2$

Se obtuvo:

$$n = \frac{2 * (1.645 + 0.842)^2 * 0.3^2}{0.31^2}$$

$$n = 11.58 = 12 \text{ pozos por grupo}$$

La muestra estuvo conformada por 60 pocillos, los cuales fueron seleccionados a conveniencia para la ubicación en los 4 grupos de diferentes concentraciones más el grupo de control.

2.3.3 Método de selección

No probabilístico, por conveniencia del investigador.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

2.4.1. Método:

Observacional

2.4.2. Descripción del procedimiento

A. De la aprobación del proyecto:

Se solicitó la aprobación del anteproyecto de tesis con la respectiva resolución decanal. N° 0631-2020.

B. De la autorización para la ejecución:

Se solicitó autorización al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. (Anexo 1)

C. De la calibración del investigador:

Para dar mayor validez y confiabilidad a la presente investigación, se realizó una prueba interevaluador, donde el investigador se entrenó y calibró de la mano con un experto en el tema (Microbiólogo) en la inspección visual de la placa Petri y medición del halo de inhibición. Los resultados obtenidos, fueron sometidos a un método estadístico de Kappa Cohen con un resultado de (1.00). (Anexo 2)

D. INSTRUMENTO

Se empleó una ficha de recolección de datos elaborada por el investigador, donde se registró la medida del halo de inhibición que se obtuvo por medio de una regla milimetrada, de cada una de las 12 muestras, por cada grupo a evaluar (5 grupos), que, a su vez, fueron registradas en la ficha elaborada. (Anexo 3)

E. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Obtención de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de *Citrus bergamia* se obtuvieron del laboratorio de aromaterapia, Ekala, de la ciudad de Lima, que fueron transportados mediante un servicio de encomiendas a la ciudad de Trujillo, y entregados al mismo investigador en óptimas condiciones con el objetivo de mantener sus propiedades físicas y químicas. Así mismo se obtuvo un certificado de análisis de dicho laboratorio de ambos aceites que nos brindó las características y propiedades de dichos aceites. (Anexo 4)

Posteriormente fueron llevadas al laboratorio de biología de la Universidad Nacional de Trujillo para realizar las diferentes diluciones del aceite esencial.

Para las diluciones a diferentes porcentajes se realizó con tween 80 que es un aditivo alimentario con acción de detergente para la dilución de óleos sin alterar sus propiedades. Se obtuvieron 4 diluciones al 100%, 75%, 50% y 25%.

2. Obtención de la cepa

Las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATTC 25175 fueron obtenidas del laboratorio GenLab del Perú Sac del departamento de Lima. Fueron transportadas mediante un servicio de encomiendas a la ciudad de Trujillo, y entregadas al investigador. Posteriormente se llevó al laboratorio de microbiología de la Facultad de medicina de la UNT para realizar los procedimientos necesarios para su mantenimiento de la mano con la microbióloga a cargo.

3. Preparación de la cepa

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATTC 25175, fueron cultivadas en tubos de ensayos conteniendo el medio Soya tripticasa; se incubaron en condiciones de micro anaerobiosis a 37°C con el objetivo de obtener colonias jóvenes. Después de 24 horas, se procedió a sembrar en medio tioglicolato, con el fin de obtener una turbidez similar al tubo número 0.5 de la Escala de Marc Farland. Los tubos, cuyo contenido tuvieron a la bacteria estudiada, fueron girados entre las manos durante 30 segundos antes de proceder con el sembrado, para poder distribuir los microorganismos de forma simultánea.

4. Inoculación de Placas

Después de haber hecho el ajuste de la turbidez del inocuo, se realizó la siembra de la bacteria en placas con Agar Mueller Hinton con sangre, para ello se sumergió un hisopo estéril en el inoculo ajustado,

embebéndolo completamente y haciendo movimientos rotatorios, antes de retirarlo se presionó con las paredes el tubo para retirar el exceso del líquido del hisopo. Luego se sembró la placa de agar sangre con el hisopo, de tal forma que el hisopo debe estriar toda la superficie de la placa de forma paralela y rotando la placa aproximadamente 60°.

5. Prueba de la susceptibilidad

Se clasificó el diámetro de los halos de inhibición teniendo en cuenta la escala de Duraffourd, utilizada para determinar el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición:

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

Para ello se preparará las 5 soluciones correspondientes a los 5 grupos. Cada placa Petri estará rotulada con el nombre al grupo perteneciente, de la misma manera, se rotulará en la Placa Petri a nivel de cada pozo que corresponde a cada grupo, para evitar confusiones a la hora de medir el halo de inhibición.

Se empleó el método de difusión en pozo en agar Mueller Hinton con sangre, para la muestra de 60 unidades de análisis fueron necesarias 15 placas Petri preparadas con cultivos de *Streptococcus mutans* ATTC 25175. en donde en cada una se realizó 4 pozos de forma equidistante, en cada uno se colocó la cantidad exacta de 5µm de aceite esencial y el grupo control. Posteriormente, para incubar las placas, se necesitará una jarra de Gas-Pack (con el método de la vela) y se incubarán a 37°C en micro anaerobiosis.

La lectura se realizará a las 24 horas de inoculadas las placas. Se medirá con una regla milimetrada el halo de inhibición de cada uno

de los grupos, luego se clasificará teniendo en cuenta la escala de Duraffourd.

2.5. Procesamiento y análisis de datos

Los datos recolectados fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 23 y Excel; los resultados fueron presentados en tablas y gráficos de acuerdo a los objetivos planteados, además se añadieron frecuencias y porcentuales. Se empleará análisis estadístico prueba de ANOVA para comparación de grupos de variables independientes, considerándose un nivel de significancia del 5%.

2.6. Consideraciones éticas:

Para la ejecución del presente trabajo de investigación, se obtuvo la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego, asimismo se siguieron los principios de la declaración de Helsinki, adoptada por la 18° Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964), revisada por la 29° Asamblea Médica Mundial y modificada en Fortaleza – Brasil, octubre 2013, teniendo presente todos los principios de bioseguridad y teniendo toda la atención hacia los factores que puedan llegar a dañar el medio ambiente.

III. RESULTADOS

Al evaluar el efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, se observó que el halo de inhibición del *Citrus bergamia* “bergamota” al 25% tuvo un promedio de 7mm \pm 2.26mm, el halo de inhibición del *Citrus bergamia* “bergamota” al 50% tuvo un promedio de 13.92mm \pm 2.31mm, el halo de inhibición del *Citrus bergamia* “bergamota” al 75% tuvo un promedio de 15.33mm \pm 2.35mm, y el halo de inhibición del *Citrus bergamia* “bergamota” al 100% tuvo un promedio de 44.25mm \pm 3.31mm. Así mismo, al comparar estos grupos se observó que existe diferencia significativa de (p=0,000). (Tabla 1)

Tabla 1. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 100%, 75%, 50% y 25% de concentración frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Concentración	N	Promedio	Desviación estándar	F	P
Citrus bergamia 25%	12	7	2.26	8.871	0,000
Citrus bergamia 50%	12	13.92	2.31		
Citrus bergamia 75%	12	15.33	2.35		
Citrus bergamia 100%	12	44.25	3.31		

Los valores obtenidos en las medidas de los halos de inhibición utilizando *Citrus bergamia* “bergamota” al 25% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, fueron en el rango de < 8mm el 58% (7 muestras), seguido del rango de 8 a 14mm incluyendo las medidas que son de 14 mm el 42% (5 muestras); mientras que en el rango de 14 a 20mm y el rango >20mm fue de 0%. (Tabla 2 y Figura 1).

Tabla 2. Porcentaje del efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 25% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

RANGO DE DIAMETRO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Nula (-): <8mm	7	58%
Sensibilidad límite (sensible +): 8 a 14mm	5	42%
Medio (muy sensible ++): 14 a 20mm	0	0%
Sumamente sensible (+++): >20mm	0	0%
TOTAL	12	100%

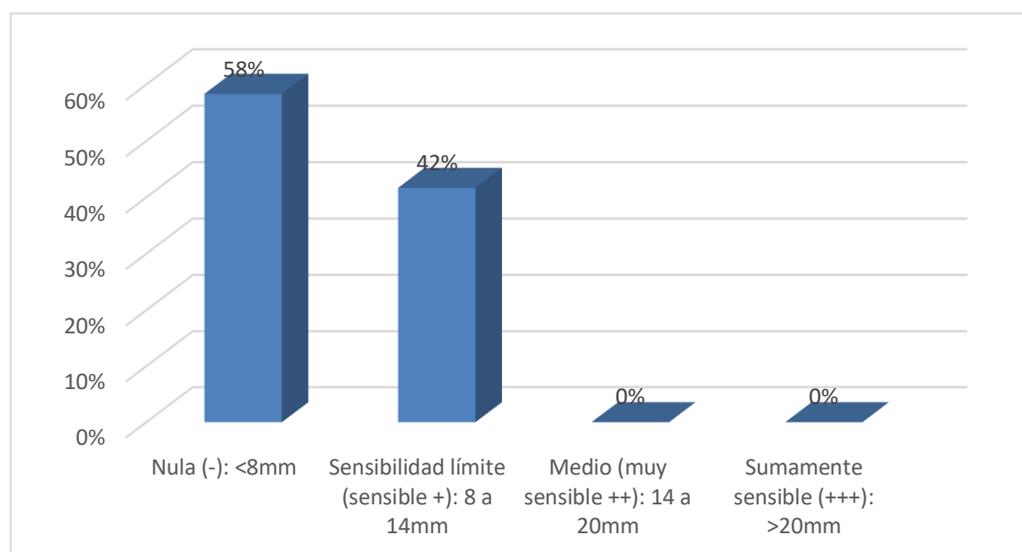


Figura 1. Efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 25% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Los valores obtenidos en las medidas de los halos de inhibición utilizando *Citrus bergamia* “bergamota” al 50% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, fueron en el rango de 8 a 14mm el 75% (9 muestras), seguido del rango de 14 a 20mm el 25% (3 muestras); mientras que en el rango de <8mm y el rango >20mm fue de 0%. (Tabla 3 y Figura 2).

Tabla 3. Porcentaje del efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 50% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

RANGO DE DIAMETRO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Nula (-): <8mm	0	0%
Sensibilidad límite (sensible +): 8 a 14mm	9	75%
Medio (muy sensible ++): 14 a 20mm	3	25%
Sumamente sensible (+++): >20mm	0	0%
TOTAL	12	100%

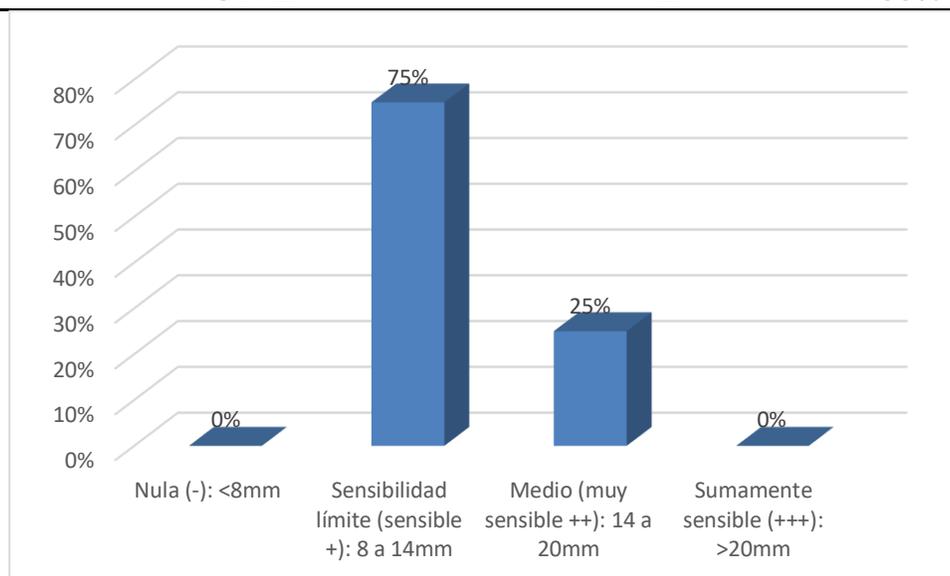


Figura 2. Efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 50% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Los valores obtenidos en las medidas de los halos de inhibición utilizando *Citrus bergamia* “bergamota” al 75% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175,

fueron en el rango de 14 a 20mm el 58% (7 muestras), seguido del rango de 8 a 14mm incluyendo las medidas que son de 14 mm el 42% (5 muestras); mientras que en el rango de <8mm y el rango >20mm fue de 0%. (Tabla 4 y Figura 3).

Tabla 4. Porcentaje del efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 75% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

RANGO DE DIAMETRO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Nula (-): <8mm	0	0%
Sensibilidad límite (sensible +): 8 a 14mm	5	42%
Medio (muy sensible ++): 14 a 20mm	7	58%
Sumamente sensible (+++): >20mm	0	0%
TOTAL	12	100%

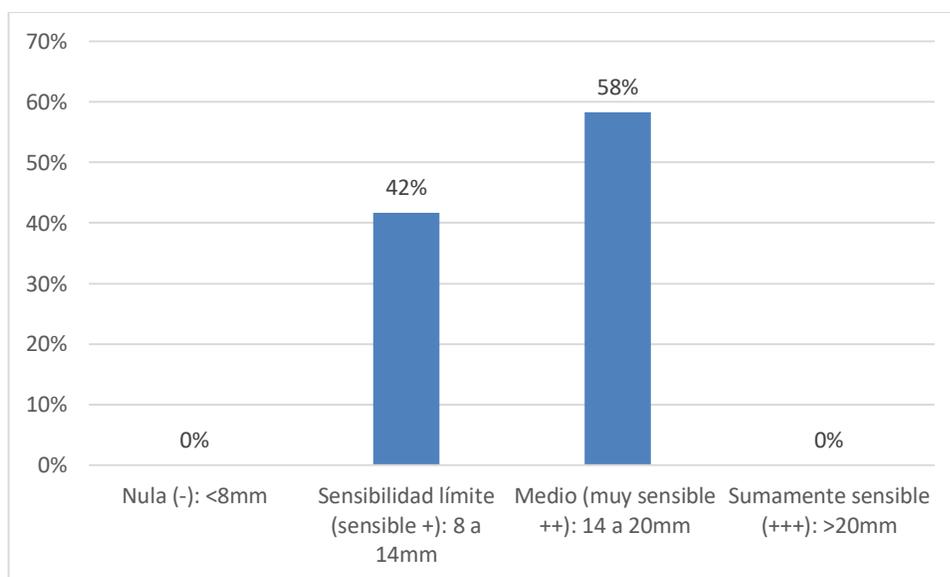


Figura 3. Efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 75% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Los valores obtenidos en las medidas de los halos de inhibición utilizando *Citrus bergamia* “bergamota” al 100% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, fueron en el rango de >20mm el 100% (12 muestras); mientras que en el rango de <8mm, 8 a 14mm y el rango de 14 a 20mm fue de 0%. (Tabla 5 y Figura 4).

Tabla 5. Porcentaje del efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 100% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

RANGO DE DIAMETRO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Nula (-): <8mm	0	0%
Sensibilidad límite (sensible +): 8 a 14mm	0	0%
Medio (muy sensible ++): 14 a 20mm	0	0%
Sumamente sensible (+++): >20mm	12	100%
TOTAL	12	100%

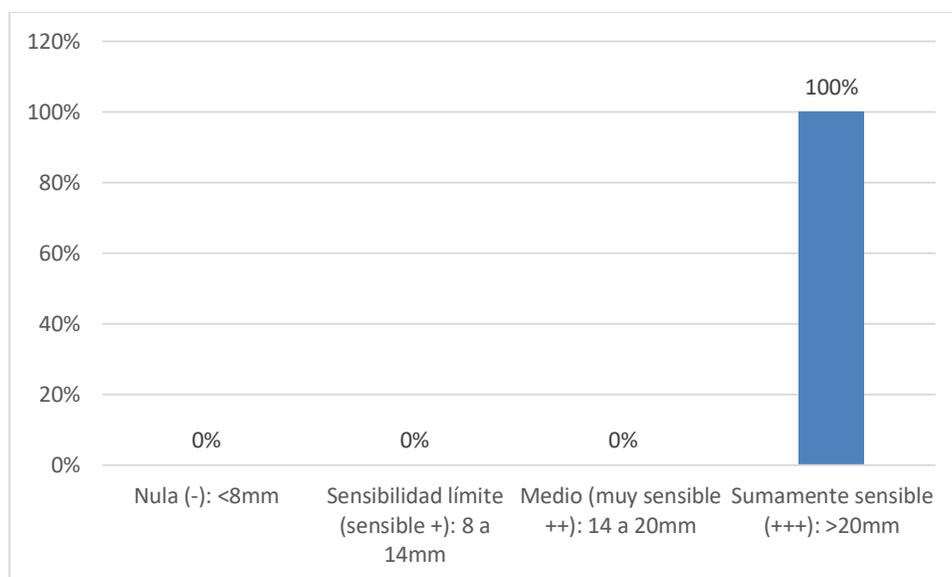


Figura 4. Efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” al 100% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

Los valores obtenidos en las medidas de los halos de inhibición utilizando Gluconato de clorhexidina al 0.12% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, fueron en el rango de 8 a 14mm el 83% (10 muestras), seguido del rango

de 14 a 20mm el 17% (2 muestras); mientras que en el rango de <8mm y el rango >20mm fue de 0%. (Tabla 6 y Figura 5).

Tabla 6. Porcentaje del efecto antibacteriano in vitro del Gluconato de clorhexidina al 0.12% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, como grupo control.

RANGO DE DIAMETRO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Nula (-): <8mm	0	0%
Sensibilidad límite (sensible +): 8 a 14mm	10	83%
Medio (muy sensible ++): 14 a 20mm	2	17%
Sumamente sensible (+++): >20mm	0	0%
TOTAL	12	100%

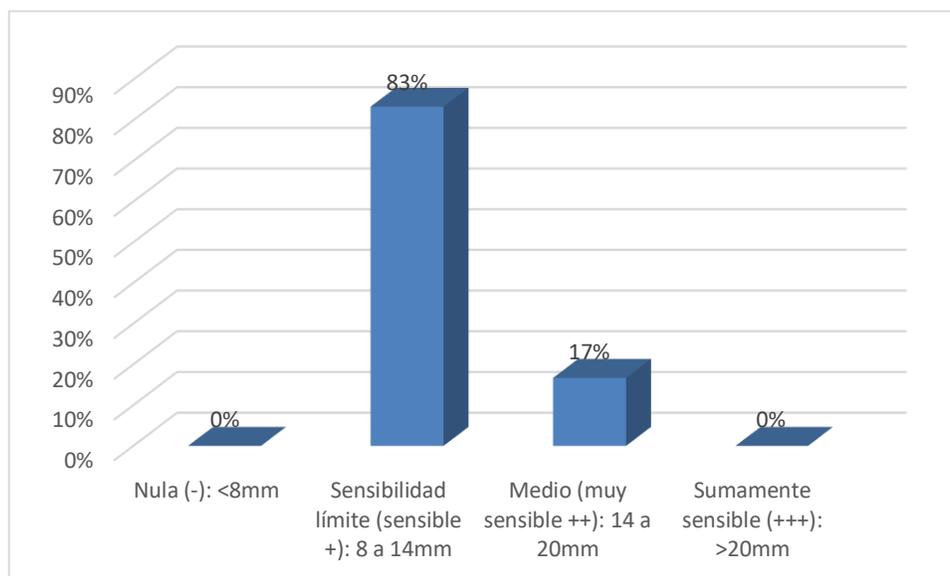


Figura 5. Efecto antibacteriano in vitro del Gluconato de clorhexidina al 0.12% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, como grupo control.

Al comparar los 5 grupos de estudio, se obtuvo que el promedio de halo fue mayor en el grupo de *Citrus bergamia* al 100% con un valor de 44.25mm y el

menor promedio de halo fue en el grupo de *Citrus bergamia* al 25% con un valor de 7mm, existiendo diferencia estadísticamente significativa $p=0,000$ mediante la prueba estadísticamente ANOVA. (Tabla 7 y Figura 6)

Tabla 7. Comparación del efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” a las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175 con el grupo control.

Concentración	N	Promedio	Desviación estándar	F	P
Citrus bergamia 25%	12	7	2.26		
Citrus bergamia 50%	12	13.92	2.31		
Citrus bergamia 75%	12	15.33	2.35	255.084	0,000
Citrus bergamia 100%	12	44.25	3.31		
Clorhexidina 0.12%	12	13.75	0.87		

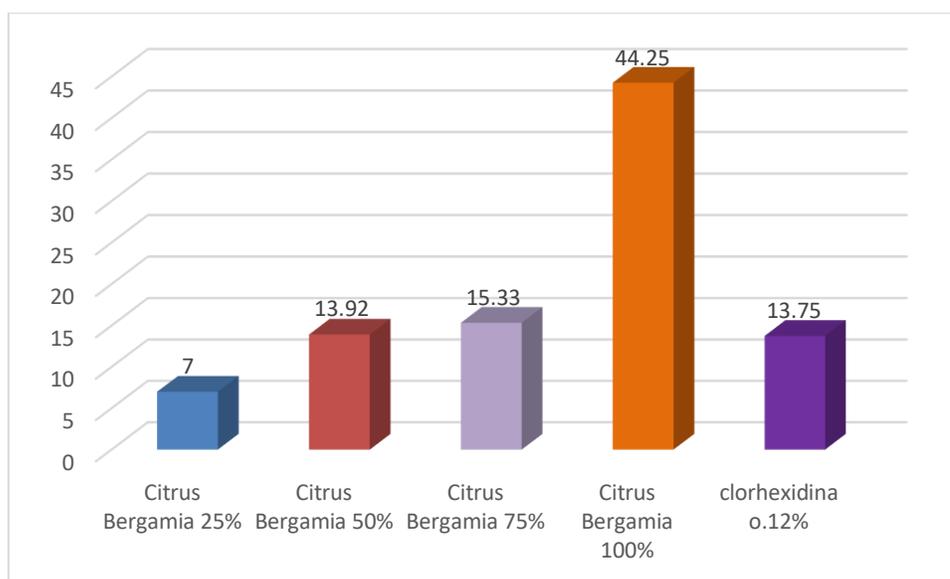


Figura 6. Efecto antibacteriano in vitro del *Citrus bergamia* “bergamota” a las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, con el grupo control.

IV. DISCUSIÓN

Hoy en día en el campo de la odontología, existe una gran tendencia hacia la búsqueda de alternativas microbianas en la medicina alternativa, es decir, alternativas de origen vegetal, cuyo fin es ser efectivas ante la resistencia de antibióticos, siendo estas alternativas un enfoque muy prometedor para el campo de la odontología ya que podrían beneficiar durante la prevención de diferentes enfermedades.²² Este estudio está basado específicamente en el estudio de dichas alternativas naturales, específicamente está basado en el aceite esencial del *Citrus bergamia*, mejor conocido como la “Bergamota” con su efecto antibacteriano contra microorganismos relacionados con la caries dental, específicamente contra el *Streptococcus mutans* ATTC 25175.

El propósito de este estudio fue proponer el uso del aceite esencial de bergamota como tal, en su forma emulsionante para obtener una alternativa viable como agente antibacterial, ya que este sería un método natural, efectivo y económico para controlar la carga bacteriana en la cavidad oral.

En el presente estudió al evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Citrus bergamia* en su manera pura, es decir al 100%; se obtuvieron resultados que evidenciaron que el *Streptococcus mutans* es sumamente sensible ante esta.

En el presente estudio los resultados concuerdan con los datos obtenidos por Verma y col²¹ (2016) y con lo propuesto por Vlad y col²⁰ (2019) quienes estudiaron la

sensibilidad del *Streptococcus mutans* con respecto a los aceites esenciales de canela, clavo, bergamota y naranja; en donde los resultados obtenidos revelaron el efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans* ejercido por el clavo, bergamota y naranja, es decir que dicha bacteria resulto siendo sumamente sensible ante dichos aceites. Además, fue demostrado el efecto de estos aceites esenciales en emulsiones binarias con el Gluconato de clorhexidina en donde se maximizo los resultados. Demostrando que la bergamota presenta un efecto antibacterial mayor que la clorhexidina al 0.12%.

Al comparar con el presente estudio, se puede confirmar el efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans*; además ha hecho un estudio más extenso en donde el efecto antibacteriano no es generalizable a todas las concentraciones, ya que, así como a la concentración de 100% es sumamente sensible, al 25% la sensibilidad es nula.

V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial del *Citrus bergamia*, presentó efectividad antibacteriana in vitro frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.
- El aceite esencial del *Citrus bergamia* a la concentración de 100%, presentó efectividad antibacteriana in vitro frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, siendo sumamente sensible.
- El aceite esencial del *Citrus bergamia* a la concentración de 75%, presentó efectividad antibacteriana in vitro frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, teniendo una sensibilidad media.
- El aceite esencial del *Citrus bergamia* a la concentración de 50%, presentó efectividad antibacteriana in vitro frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175, teniendo una sensibilidad límite.
- El aceite esencial del *Citrus bergamia* a la concentración de 25%, no presentó efectividad antibacteriana in vitro frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175.
- Al comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Citrus bergamia* “bergamota” a diferentes concentraciones frente al *Streptococcus mutans* ATTC 25175 con respecto al grupo control de Clorhidrato de clorhexidina al 0.12%, la *Citrus bergamia* al 100% presentó una efectividad antibacteriana con un mayor promedio con respecto a todas las concentraciones.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomiendan hacer estudios que determinen la posibilidad de un efecto antibacteriano de la *Citrus bergamia* a otras concentraciones que no se hayan estudiado.
- Se recomienda realizar estudios sobre el efecto antibacterial del *Citrus bergamia* “bergamota” en colutorios bucales con fines anticariogénicos.
- Realizar estudios sobre el efecto antibacterial del *Citrus bergamia* “bergamota” frente a otras bacterias periodontopatógenas de mayor relevancia.
- Realizar estudios donde se evalué el efecto sinérgico del aceite esencial de Citrus Bergamia “bergamota” con el aceite esencial de diferentes plantas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Ardila Medina Carlos Martin, Maggiolo Villalobos Silvana, Dreyer Arroyo Erik., Armijo Pérez Jacqueline, Silva Steffen Nora. Enterococcus faecalis en dientes con periodontitis apical asintomática. AMC [Internet]. 2014 Ago [citado 2019 Nov 26] ; 18(4): 415-423. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552014000400007&lng=es.
- 2) Ministerio de Salud del Perú. Prevalencia nacional de caries dental, fluorosis del esmalte y urgencia de Caries dental y sus consecuencias clínicas relacionadas al impacto en la calidad de vida de preescolares de una escuela estatal Rev Estomatol Herediana. 2019 Ene-Mar;29(1). 29 tratamiento en escolares de 6 a 8, 10, 12 y 15 años, Perú. Lima: Oficina general de epidemiología y dirección general de salud de las personas; 2005.
- 3) Silva, CF, Valenzuela, RM, & Portocarrero, MJ. (2018). Comparación del efecto antibacteriano de tres tipos de miel sobre el Streptococcus mutans (ATCC® 25175™). *Avances en Odontoestomatología*, 34(6), 294-298. Recuperado en 15 de febrero de 2020, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000600003&lng=es&tlng=es.

- 4) Rodríguez-Niklitschek Cynthia, Oporto V Gonzalo H. Determinación de la Longitud de Trabajo en Endodoncia: Implicancias Clínicas de la Anatomía Radicular y del Sistema de Canales Radiculares. Int. J. Odontostomat. [Internet]. 2014 Sep [citado 2019 Nov 27]; 8(2): 177-183. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2014000200005&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2014000200005>.
- 5) M11Ed9 | Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, 9th Edition [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m11/>
- 6) Tofiño A y col. Effect of Lippia alba and Cymbopogon citratus essential oils on biofilms of Streptococcus mutans and cytotoxicity in CHO cells. J Ethnopharmacol. 2016 Dec 24; 194:749-754. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765606>
- 7) Panpaliya N y col. In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. Saudi Dent J. 2019 Jan;31(1):76-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30723364>
- 8) Heredia-Veloz David, Abad-Coronel Dunia, Villavicencio-Caparó Ebingen. Eficacia antibacteriana de tres selladores endodónticos frente al Enterococcus faecalis. Rev. Estomatol. Herediana [Internet]. 2017 Jul [citado 2019 Nov 21]; 27(3): 132-140. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1019-43552017000300002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.20453/reh.v27i3.3197>.
- 9) Heredia-Veloz David, Abad-Coronel Dunia, Villavicencio-Caparó Ebingen. Antibacterial effectiveness of three endodontic sealers against Enterococcus faecalis. Rev. Estomatol. Herediana [Internet]. 2017 Jul [citado 2019 Nov 27]

- ; 27(3): 132-140. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1019-43552017000300002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.20453/reh.v27i3.3197>
- 10)Hersom, A.C y E.D. Hulland. 1974. *Conservas Alimenticias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp. 61-62.
 - 11)Pandey A, Kaushik A, Kumar S. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of Citrus limon. *JPBMS* 2011; 13(17): 1-7.
 - 12)Rapisarda, A., and Germanò, M. P. (2013). "*Citrus bergamia* risso and poiteau botanical classification, morphology and anatomy," in *Citrus bergamia: Bergamot and its Derivatives*, eds G. Dugo and I. Bonaccorsi (Boka Raton, FL: CCR Press), 9–11.
 - 13)Mollace, V., Ragusa, S., Sacco, I., Muscoli, C., Sculco, F., Visalli, V., et al. (2008). The protective effect of bergamot oil extract on lecithine-like oxyLDL receptor-1 expression in balloon injury-related neointima formation. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 13, 120–129. doi: 10.1177/1074248407313821
 - 14)Mollace, V., Sacco, I., Janda, E., Malara, C., Ventrice, D., Colica, C., et al. (2011). Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies. *Fitoterapia* 82, 309–316. doi: 10.1016/j.fitote.2010.10.014
 - 15)Impellizzeri, D., Bruschetta, G., Di Paola, R., Ahmad, A., Campolo, M., Cuzzocrea, S., et al. (2014). The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin Nutr.* doi: 10.1016/j.clnu.2014.11.012 [Epub ahead of print]
 - 16)Risitano, R., Currò, M., Cirmi, S., Ferlazzo, N., Campiglia, P., Caccamo, D., et al. (2014). Flavonoid fraction of *Bergamot juice* reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF-κB inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS ONE* 9:e107431. doi: 10.1371/journal.pone.0107431
 - 17)Delle Monache, S., Sanità, P., Trapasso, E., Ursino, M. R., Dugo, P., Russo, M., et al. (2013). Mechanisms underlying the anti-tumoral effects of *Citrus Bergamia* juice. *PLoS ONE* 8:e61484. doi: 10.1371/journal.pone.0061484

- 18) Navarra, M., Ursino, M. R., Ferlazzo, N., Russo, M., Schumacher, U., and Valentiner, U. (2014). Effect of *Citrus bergamia* juice on human neuroblastoma cells in vitro and in metastatic xenograft models. *Fitoterapia* 95, 83–92. doi: 10.1016/j.fitote.2014.02.009
- 19) Karaca, M., Özbek, H., Him, A., Tütüncü, M., Akkan, H. A., and Kaplanoğlu, V. (2007). Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil. *Eur. J. Gen. Med.* 4, 176–179.
- 20) Vlad, T. Atena, G. Iuliana, P. Emil, T. Diana, O. Alin, D. Antonis, P. Daniela, J, et. Al. (2019) Synergistic/Antagonistic Potential of Natural Preparations Based on Essential Oils Against *Streptococcus mutans* from the Oral Cavity, *Moléculas* 2019 , 24 (22), 4043; <https://doi.org/10.3390/molecules24224043>
- 21) Verma, S.K.; Goswami, P.; Verma, R.S.; Padalia, R.C.; Chauhan, A.; Singh, V.R.; Darokar, M.P. Chemical composition and antimicrobial activity of bergamot-mint (*Mentha citrata* Ehrh.) essential oils isolated from the herbage and aqueous distillate using different methods. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, 91, 152–160.
- 22) Pimentel E y col. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev. Estomatol. Herediana* [Internet]. 2015 Oct [citado 2020 Mar 9]; 25(4): 268-277. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1019-43552015000400004&lng=es.

ANEXOS

ANEXO 1

CONSTANCIA DE SUPERVISIÓN DE PROYECTO

Yo, Elva Manuela Mejía Delgado, bióloga, identificada con el N° C.B.P 00548, hago **CONSTAR** la supervisión de ejecución y prueba de calibración de la tesis, realizada en los ambientes del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, titulada:

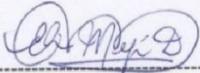
**“EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL *CITRUS BERGAMIA*”
BERGAMOTA” SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS ATTC 25175*”**

Alumno: Bach. Katherine Giohana Campos Layza

ID: 000140764

Se expide la presente para fines convenientes.

Trujillo, febrero del 2020



Dra. Elva Manuela Mejía Delgado

N° C.B.P 00548

ANEXO 2

Variable	n	Calibración	% de concordancia	Kappa	*p
Citrus Bergamia "bergamota" al 25%	4	Interevaluador	100%	1.00	<0.01
Citrus Bergamia "bergamota" al 50%	4	Interevaluador	100%	1.00	<0.01
Citrus Bergamia "bergamota" al 75%	4	Interevaluador	100%	1.00	<0.01
Citrus Bergamia "bergamota" al 100%	4	Interevaluador	100%	1.00	<0.01
Gluconato de clorhexidina	4	Interevaluador	100%	1.00	<0.01

*Kappa de Cohen
Puntuación casi perfecta

ANEXO 3

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
MUESTRA	Halos de Inhibición (mm)				
	<i>Citrus Bergamia</i> "Bergamota" (100%)	<i>Citrus Bergamia</i> "Bergamota" (75%)	<i>Citrus Bergamia</i> "Bergamota" (50%)	<i>Citrus Bergamia</i> "Bergamota" (25%)	<i>Gluconato de</i> <i>clorhexidina</i> 0.12%
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

12					
----	--	--	--	--	--

ANEXO 4



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Producto:	Aceite esencial de bergamota
Nombre botánico:	Citrus Bergamia
Sinónimos:	Citrus Bergamia Risso
Lote N°:	8001-34-7
Fecha de destilación:	Noviembre 2019
Fecha de vencimiento:	Enero 2022
Color:	Amarillo verdoso
Aroma:	Cítrico característico de la bergamota
Método de extracción:	Por presión de la corteza
País de origen:	Italia
Aceites 100% puros y naturales	

PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS	RANGO	RESULTADOS
Gravedad específica a 20°C	1.038 – 1.060	1.053
Rotación óptica a 25°C	{-}2° a {+}0.0°	0°
Índice de refracción a 25°C	1.528 – 1.537	1.531
Solubilidad	Solubles en alcohol y aceites. Insoluble en agua	

OTRAS PROPIEDADES:

Ninguna

Diciembre 2019

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto 201. San Borja

Teléfono: 337-2290 Célular: 977 779 444

www.ekala.pe