

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



EVALUACION DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DE UN
COLUTORIO DE ACEITE ESENCIAL de *Origanum vulgare* L. (OREGANO)
SOBRE *Streptococcus mutans*.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

MARVIN MOISES ESCOBAR RIVERA
ANA ISABEL TORRES PARADA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

AGOSTO, 2016

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINA

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

LIC. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL INTERINA

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL EVALUADOR

**COORDINADORA DE AREA DE INDUSTRIA FARMACEUTICA, COSMETICA
Y VETERINARIOS**

Lic. Ana Cecilia Monterrosa Fernández

**COORDINADORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTES ASESORES

MSc. Enrique Posada Granados

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial queremos agradecer a:

Al tribunal calificador: Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MSc. Ena Edith Herrera Salazar, MSc. Cacilia Haydeé Gallardo de Velásquez, Licda. Ana Cecilia Monterrosa Fernández y MSc. Rocío Ruano de Sandoval por su paciencia, apoyo y orientación.

A nuestros docentes directores: MSc. Enrique Posada Granados y Dr. Tania Ethel Cuadra Zelaya, por brindarnos los lineamientos necesarios para la realización de nuestro trabajo de graduación pero sobre todo por el compromiso, la entrega y el apoyo recibido en cada momento de su parte.

Al laboratorio de CENSALUD de la Universidad de El Salvador: Por darnos la oportunidad de realizar la etapa experimental fundamental para nuestro trabajo de graduación en tan prestigiosas instalaciones de laboratorio. En particular a la MSc. Amy Elieth Moran coordinadora del Laboratorios de Control de Calidad Microbiológico y al Lic. Stanley Rodríguez por su apoyo técnico.

Al Laboratorio y docentes de la catedra Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador: Por su valiosa colaboración para la ejecución de este trabajo de graduación

DEDICATORIAS

A Dios por haberme dado la sabiduría para poder culminar mi carrera.

A mi mamá, Teresa Rivera, que siempre me han dado su apoyo incondicional y a quien debo este triunfo profesional, por todo su trabajo y dedicación para darme una formación académica.

A mi hermano Mauricio Escobar, por apoyo incondicional y a toda mi familia en especial a mi abuela, Teresa Garay por darme todo su apoyo incondicional y estar en todo momento al pendiente de mí.

A mi amiga y querida compañera de trabajo de graduación, Isabel Torres, por su apoyo incondicional y por su tiempo dedicado a nuestro trabajo de graduación y a todos mis amigos que me brindaron su apoyo y colaboración.

Marvin Moisés Escobar

DEDICATORIAS

A Dios Todo Poderoso: Por regalarme la salud, la sabiduría, la perseverancia y sobre todo el espíritu de lucha que hasta el día de ahora me ha permitido culminar con éxito todo lo que mi corazón ha anhelado muestra de ello el orgullo de haber culminado con inmensa satisfacción mi trabajo de graduación.

A Mi Amado Abuelo: Por ser mi Padre en la tierra por regalarme su tiempo, sus consejos, su apoyo y sobre por enseñarme a sentirme orgullosa de quien soy y de dónde vengo, a dar paso firmes por la vida con la conciencia plena de ser siempre la mejor decisión.

A Mi Maravillosa madre: Por regalarme el enorme placer de poderla llamar mami, por ser mi mayor inspiración en la vida, por formarme como una mujer de bien y enseñarme que las cosas en la vida se ganan con esfuerzo y perseverancia; por levantarme cuando flaqueaba y celebrar mis éxitos.

A mis queridos hermanos: Por inyectarme la energía que necesitaba cuando estaba cansada con sus bromas y ocurrencias, por hacerme ver mis fallas y aplaudir mis aciertos los amo mis pichones grandes.

A Mis Ángeles en la tierra: Mis tíos por ser mis segundos padres y madres y apoyar cada una de mis decisiones sin dejar de darme ánimos y razones para seguir adelante.

A mi Estimado Compañero de trabajo de graduación: Por su amistad, por su apoyo y comprensión en cada aventura emprendida a lo largo del desarrollo del trabajo de graduación.

Ana Isabel Torres

INDICE GENERAL

Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introduccion	xvii
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teorico	22
3.1 Monografía Del Orégano	22
3.2 Potencial Antimicrobiano Del Aceite Esencial De <i>Origanum Vulgare</i> L.	24
3.3 Caries Dental	25
3.3.1 Placa Dental	27
3.3.2 Sustancias químicas empleadas en los colutorios	28
3.4 Generalidades de la Cepa Sometida a Ensayo	33
3.4.1 Morfología	33
3.4.2 Cultivo	34
3.4.3 Características de la colonización Con <i>S. mutans</i>	34
3.5 Evaluación De La Actividad Antimicrobiana	35
3.5.1 Concentración Inhibitoria Mínima	35
3.5.2 Reto Microbiano Para La Verificación De La Eficacia	35
3.6 Definiciones	38
3.6.1 Aceite Esencial	38
3.6.2 Colutorio	38
3.6.2 Sustantividad	38
Capitulo IV	
4.0 Diseño Metodologico	40
4.1 Tipo de Estudio	40
4.2 Investigación Bibliográfica	40
4.3 Investigación De Campo	41

4.4 Parte Experimental	42
4.4.1 Realización del ensayo CIM del aceite esencial de <i>O. vulgare</i> L. sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175	43
4.4.2 Determinación de la adecuabilidad del método de recuento	54
4.4.3 Determinación de la eficacia antibacteriana In Vitro	56
CAPITULO V	
5.0 Resultados Y Discusión De Resultados	60
5.1 Realización Del Ensayo Cim Del Aceite Esencial De Orégano Sobre <i>S. mutans</i>	60
5.1.1 Pruebas de solubilidad del aceite esencial de <i>O. vulgare</i> L.	60
5.1.2 Preparación del inculo de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	62
5.1.4 Preparación de solución Stock de AEO.	65
3.1.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	66
5.3 Determinación De La Eficacia Antibacteriana In Vitro De Los Colutorios	75
5.4 Comparación de la eficacia antibacteriana de los colutorios de aceite esencial de orégano y colutorio de Clorhexidina 0.12%	83
CAPITULO VI	
6.0 Conclusiones	86
CAPITULO VII	
7.0 Recomendaciones	88
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. <i>Origanum vulgare</i> L.	22
2. Estructura química de los principales componentes en el aceite Esencial de <i>O. vulgare</i> L.	23
3. Esquema de reanimación de la cepa <i>S. mutans</i> ATCC 25175	46
4. Esquema de Preparación de cultivos estandarizados de trabajo	50
5. Esquema de la preparación de la suspensión de prueba de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 para el ensayo	52
6. Esquema de distribución de las soluciones en la microplaca para la determinación de la CIM	53
7. Esquema de la verificación de inóculo en microplaca	53
8. Esquema de Adecuabilidad del Método de Recuento	56
9. Esquema de la determinación de la eficacia antimicrobiana	58
10. Microplaca después de incubar	67
11. Absorbancias promedio versus concentraciones de AEO	70
12. Concentración UFC/mL versus tiempo de exposición en el vehículo	79
13. Concentración de <i>S. mutans</i> (UFC/mL) versus tiempo de exposición en el colutorio de AEO 0.05%	80
14. Concentración de <i>S. mutans</i> UFC/mL versus tiempo de exposición en el colutorio de AEO 0.10%	81
15. Concentración de <i>S. mutans</i> UFC/mL versus tiempo de exposición en el colutorio de CHX 0.12%	82
16. Comportamiento de los cuatro grupos de prueba estudiados frente a <i>S. mutans</i>	83

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Composición química del colutorio de aceite esencial de <i>O. vulgare</i> L. al 0.05 %y 0.10 %	42
2. Solventes y solubilizantes seleccionados para incorporar el AEO	44
3. Preparación de diluciones pruebas del aceite esencial de AEO para ensayo de CIM sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175	48
4. Resultados de solubilidad del AEO	60
5. Resultados de ensayo de estandarización de <i>S. mutans</i>	64
6. Ensayo de solubilidad del AEO en caldo BHI	66
7. Valores corregidos de absorbancias antes y después de incubar microplaca	69
8. Número de colonias en cada placa de grupos de Prueba	72
9. Numero de colonias en cada placa de Grupos de Prueba	74
10. Numero de colonias en cada placa de Grupos de Prueba	74
11. Recuentos microbianos en tiempo cero en las formulaciones estudiadas	75
12. Recuentos microbianos en los diferentes tiempos de prueba para cada una de las formulaciones estudiadas.	76
13. Porcentaje de reducción de los diferentes grupos de prueba	77

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Fotografías del trabajo en el laboratorio
2. Materiales y equipos
3. Preparación de medios de cultivo
4. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación
5. Certificado de análisis de la cepa
6. Esquema de preparación de diluciones prueba del AEO
7. Datos crudos (Raw Data) de las absorbancias de los pocillos de microplaca

SIGLAS

AEO:	Aceite Esencial de Orégano
AMH:	Agar Müeller Hinton.
AOAC:	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
ATCC:	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BHI:	Infusión de Cerebro Corazón (Brain, Heart, Infusion)
CASOY:	Caldo Digerido de Caseína y Soya
CBUES:	Consortio de Bibliotecas Universitarias de El Salvador.
CENSALUD:	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
CHX:	Gluconato de clorhexidina
CIM:	Concentración Inhibitoria Mínima
CMH:	Caldo Müeller Hinton.
DMSO:	DimetilSulfóxido
LSS:	Lauril sulfato de sodio
MNPC:	Muy numeroso para contar
PPG:	Propilenglicol
UFC:	Unidad Formadora de Colonias.
USAM:	Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
V.P:	Voges Proskauer

ABREVIATURAS

Col.: Colaboradores

mg.: Miligramo.

min.: Minuto.

mL.: Mililitro.

O. vulgare L.: *Origanum vulgare* L.

S. mutans: *Streptococcus mutans*

°C.: Grados Celcius

% p/v: Porcentaje peso/volumen

5.00E+05: Expresión de programa EXCEL para la notación científica que indica por ejemplo 5×10^5

RESUMEN

Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar la eficacia antibacteriana in vitro de dos formulaciones de un colutorio de aceite esencial de orégano sobre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) el principal agente causal de la placa bacteriana dental, para determinar dicha actividad, primero se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de orégano (AEO) sobre *S. mutans* mediante el método de microdilución en caldo y se obtuvo una CIM de 0.0025 %, esa concentración o una mayor podría ser útil en una forma farmacéutica con propósito antibacteriano.

Además, se realizó la determinación de la aptitud de los métodos de recuento microbiano que permitió indicar la metodología adecuada para evaluar la biocarga microbiana en los colutorios. Esta prueba indicó que el polisorbato 80 al 1% es un agente neutralizante idóneo para recuperar el *S. mutans* si se encuentra presente en los colutorios de AEO al 0.05 % y 0.10 %, y la mezcla de tiosulfato de sodio al 0.3 %, lecitina al 0.5% y polisorbato 80 al 1 % es la indicada para neutralizar las propiedades antimicrobianas del colutorio de clorhexidina al 0.12 % y así lograr una recuperación adecuada del microorganismo en estudio cuando estuviera presente.

Finalmente, se realizó la determinación de la eficacia antibacteriana de los colutorios de AEO, el vehículo de estos y un colutorio comercial de clorhexidina sobre *S. mutans*, los resultados obtenidos reflejaron que el porcentaje máximo alcanzado de reducción para los colutorios de AEO al 0.05% y 0.10 % fue de 48.280 % a los 15 minutos y de 78.535 % en 1 minuto respectivamente, dichas reducciones fueron mayores que la que presentó el vehículo, la cual fue de 29.292 % a los 15 minutos. El colutorio de clorhexidina al 0.12 % fue el que produjo la máxima reducción del microorganismo de estudio, la cual fue de

99.996% en 6 minutos. Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, durante el periodo de julio a septiembre de 2015.

Con estos resultados se concluyó que, si bien ningún colutorio alcanzó el 99.999 % de reducción especificado por la AOAC para germicidas y sanitizantes, se observaron reducciones que sugieren buenas perspectivas de desarrollo para este tipo de formulaciones que incluyen activos de origen natural, por lo tanto se recomienda la necesidad de realizar más estudios sobre la composición y diferentes actividades del aceite esencial de orégano que pueden aprovecharse en futuras formulaciones.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

En el mercado existe una amplia gama de productos destinados a la reducción de la placa bacteriana, la cual tras su acumulación genera enfermedades bucodentales como la gingivitis y la caries dental. La mayoría de estos productos han sido formulados con productos que tras su uso cotidiano generan efectos indeseados como tinción de los dientes, descamación de las membranas mucosas y alteración, tal es el caso de los colutorios formulados con gluconato de clorhexidina.

Debido a los efectos adversos producidos por los actuales colutorios comerciales, existe una tendencia marcada por el empleo de sustancia de origen natural como los aceites esenciales de reconocido poder antiséptico entre ellos el aceite esencial de orégano que dentro de su composición química presenta compuestos fenólicos como el carvacrol y timol los cuales aseguran la presencia de actividad antibacteriana por parte de este aceite. Se cuenta con estudios que demuestran que este aceite posee la capacidad de inhibir el crecimiento de un gran número de bacterias en particular el *S. mutans* considerado uno de los principales agentes causales de las enfermedades bucodentales.

La existencia de información que respalda la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano, motivó el diseño, formulación y desarrollo de un colutorio de aceite esencial de orégano como parte de un proyecto multidisciplinario entre la Facultades de Odontología y Química y Farmacia. El cual requería estudios que permitieran respaldar la eficacia y seguridad para su uso en la reducción y prevención de las enfermedades bucodentales como la gingivitis y la caries. En este trabajo de investigación se presentan los resultados de los ensayos de la determinación de la concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de orégano comercial utilizado como componente activo, demostración de la aptitud

del método de recuento y eficacia antibacteriana in vitro frente a una cepa de *S. mutans*, de las diferentes formulaciones propuestas por el departamento de tecnología farmacéutica, los cuales indican la utilidad de estas como una alternativa frente a los colutorios comerciales existentes. Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, durante el periodo de julio a septiembre de 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia antibacteriana in vitro de un colutorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Streptococcus mutans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Realizar ensayo de concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2.2.2 Determinar la adecuabilidad del método de recuento utilizado para evaluar el contenido bacteriano del colutorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. 0.10%, el vehículo y de colutorio de clorhexidina 0.12%

2.2.3 Conocer la eficacia antibacteriana in vitro de los colutorios de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. en estudio y de un colutorio de gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC25175.

2.2.4 Comparar la eficacia antibacteriana in vitro de los colutorios de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. estudiados y colutorio de Gluconato de clorhexidina 0.12%.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 MONOGRAFÍA DEL ORÉGANO

A. Clasificación Taxonómica ⁽³³⁾

- Nombre científico: *Origanum vulgare* L.
- Origen: Oriente Medio.
- Clase: Equisetopsida.
- Subclase: Magnoliidae
- Superorden: Asteraceae
- Orden: Lamiales
- Familia: Lamiaceae
- Género: *Origanum*
- Especie: *vulgare* L.
- Nombre común: Orégano, Mejorana silvestre, Orenga.



Figura N°1 *Origanum vulgare* L. ⁽³³⁾

B. Composición química del aceite esencial de *O. vulgare* L.

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *O. vulgare* L. son el carvacrol, timol, r-cimeno y y-terpineno, a un porcentaje entre el 29 y 73 %, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes, se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano, los cuales están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles timol y carvacrol. ⁽²⁾

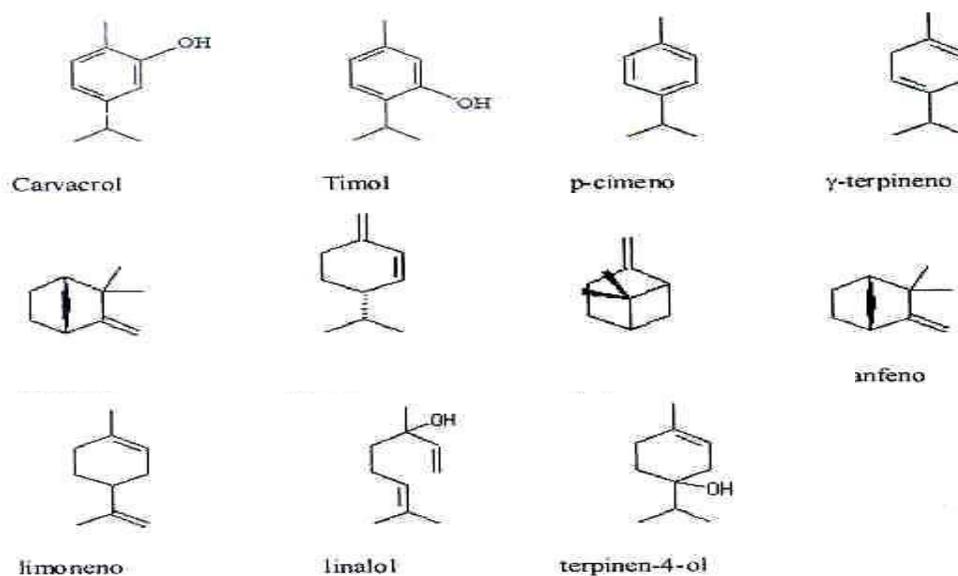


Figura N° 2 Estructura química de los principales componentes en el aceite esencial de *O. vulgare* L. (2)

C. Usos

El *O. vulgare* L. (orégano) tiene usos tradicionales, culinarios y cosméticos. Es utilizado en forma fresca y seca en la cocina mediterránea y de América Latina. Debido a la capacidad antioxidante de los extractos acuosos del orégano, se sugiere que éstos pueden ser empleados como sustitutos de los antioxidantes sintéticos (32).

- En infusión ayuda a las alteraciones digestivas, bronquitis, tos y asma.
- Muy utilizado interna o externamente en tratamientos de afecciones respiratorias con tos, pues posee acción expectorante.
- Tiene propiedades sedantes digestivas.
- En reglas dolorosas se emplea como calmante y regulador.
- Antiséptico de las vías respiratorias. Los dolores y reumas se alivian con friegas con aceite de orégano y cataplasmas de la planta (32).

Existen estudios in vitro utilizando diferentes metodologías que demuestran la existencia de actividad antimicrobiana en el orégano como se muestra en el Cuadro N°1.

Cuadro N° 1: Propiedades comprobadas a nivel in vitro del aceite esencial de *O. vulgare* L. (3, 4)

Propiedad	Evidencia que la respalda	Autores que la reportan
Actividad antioxidante	Baja oxidación en carnes de porcino y bovino tratadas con el aceite esencial	Cardona Henao, Luis Eduardo y Col. (2009)
Actividad bactericida	Inhibición del crecimiento de bacterias que pertenecen a los géneros: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Corynebacterium</i>	Bastos Oyarzabal, Marta Elaine y Col. (2011)

3.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L.

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo. Otros compuestos, como el g-terpineno y r-cimeno no

mostraron actividad contra las bacterias estudiadas. Los valores de la CIM para los aceites esenciales de *O. vulgare* L. se han establecido entre 0.28-1.27 mg/mL para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/mL para hongos (2, 6).

Existen estudios de CIM para *O. vulgare* L. utilizando diversas metodologías y que reportan CIM como se indican en el Cuadro N°2.

Cuadro N° 2 Concentración inhibitoria mínima reportada del aceite esencial de *Origanum vulgare* L.

Autor	Microrganismo de prueba	Método	CIM (% p/v)
Cassiano Busatta, et al 2007 (5)	<i>Streptococcus mutans</i>	Método de densidad	0.069 %
	<i>Staphylococcus aureus</i>	óptica en microtubos de 0 a 24 horas	0.023 %
	<i>Escherichia coli</i>		0.046 %
Souza Prestes, et al 2008 (26)	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Microdilución en caldo	12 %
	<i>Staphylococcus aureus</i>		1,56 %
Leite de Souza, et al. 2009 (10)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Microdilución en caldo	0.06 % (v/v)

3.3 CARIES DENTAL (21)

Es una enfermedad multifactorial de origen microbiano que afecta los tejidos duros de las piezas dentarias provocando su desmineralización y consecuente destrucción. Este proceso se desarrolla en forma permanente, continua e irreversible que avanza desde el exterior hacia el interior hasta alcanzar la pulpa dental. La caries es una enfermedad multifactorial porque para que se desarrolle la caries deben estar presentes varios factores que actúan en conjunto los cuales son:

- a) Microorganismos: La cavidad bucal contiene una de las más variadas y concentradas poblaciones microbianas del organismo. Se estima que en ella habitan entre 200 y 300 especies. Entre las bacterias presentes en boca se encuentran tres especies principalmente relacionadas con la caries: *Streptococcus* con las subespecies *S. mutans* y *S. sobrinus*, *Lactobacillus* y *Actinomyces*. De todos ellos, *S. mutans* es el más cariogénico, el cual es capaz de inducir caries en cualquier superficie del diente.
- b) Dieta: El *Streptococcus mutans* para poder producir glucano y polisacáridos responsables de la adhesión bacteriana, necesitan de un sustrato que consiste en la ingesta de carbohidratos, principalmente ya que es el carbohidrato fermentable con mayor potencial cariogénico.
- c) Huésped: Los factores ligados al huésped pueden distribuirse en dos grandes grupos: La saliva y los dientes.

- La saliva:

La participación de la saliva en el proceso carioso ha sido corroborada mediante estudios diversos, en los cuales, al disminuir el flujo salival, se observó un incremento sustancial de los niveles de lesiones de caries.

- Los dientes:

La caries dental se manifiesta en el esmalte, el cual se torna susceptible de ser destruido por los ácidos o por su propia configuración anatómica, como en los casos de surcos, fisuras y puntos.

Posteriormente, Newbrun, en 1978, añadió el factor tiempo como cuarto factor etiológico.

d) Tiempo: Se considera que una frecuencia de carbohidratos por encima de seis veces diarias contribuye a aumentar el riesgo de caries.

Todos estos factores deben estar presentes en conjunto para que se desarrolle la enfermedad ya que por sí solos son insuficientes para provocar la desmineralización de los tejidos duros del diente.

3.3.1 Placa Dental

Las bacterias que se encuentran en la saliva pueden ser consideradas bacterias planctónicas (bacterias que flotan en una fase líquida). Sin embargo, las bacterias que se encuentran en una superficie dura (dientes, reconstrucciones, prótesis e implantes) forman una película gelatinosa adherente: placa dental. La placa dental es el principal agente etiológico de la caries y de las enfermedades periodontales. Egelberg et al 1965, determinaron los estadios en la formación de la placa dental. Estos autores definieron:

Un primer estadio o fase I: en la que se formaría una biopelícula sobre la superficie limpia del diente. Esta biopelícula estaría compuesta fundamentalmente por glicoproteínas.

Un segundo estadio o fase II: en esta fase se observa la adhesión de unos determinados tipos de bacterias a la biopelícula previamente formada.

Fase III: Se produce multiplicación bacteriana.

Fase IV: Debido a la multiplicación bacteriana de la fase anterior y a la aparición de nuevas condiciones, se produce la coagregación de nuevas especies bacterianas.

En los años 90, gracias al desarrollo y perfeccionamiento del microscopio confocal de láser, se llegó a un mejor conocimiento de la placa dental y de su estructura, y se desarrolló el modelo de la placa dental. Los biofilm presentan una

serie de características que plantean una serie de problemas en cuanto a su eliminación. Un biofilm o placa dental es la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias y se definió en un principio como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido. Posteriormente Costerton (1987), definió el biofilm como: una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o expresión de sus genes (23).

El tratamiento de las enfermedades periodontales se basa fundamentalmente en el control de la placa bacteriana oral.

El control de la placa bacteriana por parte del paciente es esencial para el tratamiento y el mantenimiento de la enfermedad periodontal. Unas adecuadas técnicas de higiene dental mediante cepillado y uso de la seda pueden llegar a eliminarla totalidad de la placa bacteriana. Sin embargo, el aprendizaje de técnicas correctas requiere un periodo largo de entrenamiento en cuanto a destreza y motivación por parte del paciente. La experiencia clínica y los estudios de población demuestran que los métodos de higiene se utilizan de manera insuficiente por la gran mayoría de los pacientes y por ello, el uso de colutorios se considera una ayuda en el control de la placa y la prevención de enfermedades orales (18).

3.3.2 Sustancias químicas empleadas en los colutorios

Un colutorio antiplaca o comúnmente llamado enjuague bucal es un agente químico antimicrobiano, vehiculizado en forma líquida para poder ser utilizado en la cavidad oral. Los agente químicos antimicrobianos deben ser capaces de

destruir microorganismos, inhibir su reproducción o su metabolismo. Muchos son bactericidas y alguno bacteriostáticos. El colutorio de mayor efectividad hasta el momento y aprobado por la ADA es la clorhexidina al 0.12%.⁽¹⁸⁾

La enorme cantidad de productos propuestos, hizo que expertos en la materia se reunieran en 1993 en un Workshop Europeo titulado “Control químico de la placa para la prevención de las enfermedades periodontales”, tras el cual, se definió un gran grupo de compuestos antiplaca de los cuales los más utilizados son los siguientes:

3.3.2.1 Bisbiguanidas ⁽¹⁸⁾

Compuestos químicos que presentan un amplio espectro de acción, siendo activos frente a bacterias Gram + y Gram -, hongos y levaduras. El representante más conocido de este grupo es la clorhexidina.

La clorhexidina es el agente antimicrobiano más estudiado, capaz de mantener las superficies dentarias libres de placa al utilizarlo bajo un régimen recomendado. Fue presentado en 1954 y está reconocido por la Asociación Dental Americana (ADA) como agente antimicrobiano. Es uno de los agentes antiplaca y antigingivitis más utilizados y actualmente es considerado como control positivo en estudios para comparar la efectividad de otros agentes. Una de sus mejores características es la sustentividad, gracias a la cual se une fuertemente a superficies de la cavidad oral y posteriormente actúa como un depósito de liberación lenta pudiendo tener actividad antimicrobiana durante 7 horas.

Posee acción antibacteriana y antiplaca mediante la inhibición de la formación de la película adquirida y la adhesión de microorganismos a la película adquirida,

además de destruir la placa ya formada. Dentro de las ventajas que se le conocen se encuentran el disminuir los índices de placa entre un 50-55%, disminuir la gingivitis en un 45%. Al igual existe información de efectos secundarios manifestados tras su uso regular entre ellos la tinción de los dientes, restauraciones estéticas y lengua, descamación de la mucosa oral, alterar el sistema del gusto entre otras molestias menores.

Los productos que se comercializan actualmente en España con CHX como colutorio contienen en la mayoría de los casos concentraciones de 0,12% y 0,20%. Si prescribimos CHX con una concentración de 0,12%, se necesitará mayor volumen de colutorio y mayor tiempo de exposición para obtener los mismos efectos que al utilizar clorhexidina al 0,20% a menores dosis y menor tiempo de enjuague. Se sabe que la solución al 0,12% tiene un gusto más aceptable.

3.3.2.2 Compuestos de amonio cuaternario ⁽¹⁸⁾.

Agentes inhibidores de la formación de placa que también presentan tendencia a unirse a los tejidos orales debido a su fuerte carga positiva. El más conocido es el cetilpiridinio. Este agente, es liberado a mayor velocidad que la clorhexidina, siendo su sustantividad de aproximadamente 3 horas. Los estudios han mostrado su efectividad antiplaca, aunque el efecto sobre la gingivitis no está tan claro. Lo más común es utilizarlo en concentraciones de 0,05%.

Posee un efecto antiplaca, con una menor sustantividad que la CHX y entre sus efectos adversos se puede mencionar que tiñe los dientes, aumentan la formación de cálculos, producen ardor en mucosas abiertas y generan descamaciones.

3.3.2.3 Aceites esenciales ⁽⁸⁾

Son agentes antisépticos, es decir, agentes capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de ciertos microorganismos. Los componentes de los aceites esenciales son básicamente el timol, carvacrol y eugenol, los cuales con son compuestos fenólicos, poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos, actúan provocando desorden en la membrana citoplasmática.

El producto oral más antiguo es probablemente el Listerine®, una combinación de los aceites esenciales fenólicos, timol y eucalipto, mezclados con mentol y metilsalicilato en un vehículo hidroalcohólico al 26,9%. Los estudios clínicos se iniciaron en los años 70 y fueron estudios de corta duración, oscilando entre 7 y 60 días e indicaron reducciones estadísticamente significativas de los niveles de placa y gingivitis (alrededor del 35%), cuando los enjuagues se utilizaron tanto en presencia como en ausencia de procedimientos de higiene oral. Los estudios más recientes ya siguieron las directrices de la ADA y fueron de 6 meses de duración. La reducción de la placa osciló entre un 20 y un 34% y la reducción de la gingivitis entre un 28 y un 34% cuando se realizó el enjuague con Listerine® dos veces al día a continuación del cepillado. Estudios microbiológicos demuestran que no hubo aparición de oportunistas, potencial o presuntamente patógenos.

Su mecanismo de acción se encuentra asociado a la desorganización de la pared celular, inhibición de enzimas bacterianas y la extracción de endotoxinas derivada del polisacárido de las bacterias Gram (-). Disminuyen los niveles de placa alrededor de un 20-34%, disminuyen la gingivitis en un 35% y no hay aparición de oportunistas, potencial o presuntamente patógenos. Entre los efectos adversos se puede mencionar que provoca una sensación de

astringencia en la boca, sabor amargo aun que desaparece tras el hábito de uso, y lo más importante produce mínima tinción.

Mecanismo de acción del Carvacrol ⁽⁸⁾

El Carvacrol actúa desintegrando la membrana externa de las bacterias Gram negativas permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del proton. En bacterias Gram positivas como el *Bacillus cereus* el carvacrol ejerce su acción al nivel de la membrana celular disolviéndose en la bicapafosfolipídica, alineándose entre las cadenas de ácidos grasos. Esta distorsión de la estructura física puede causar la expansión y desestabilización de la membrana, incrementando la fluidez de la misma provocando un aumento en la permeabilidad permitiendo que los iones dejen el citoplasma.

Mecanismo de acción del Timol ⁽⁸⁾

El mecanismo de acción del timol es similar a la del carvacrol, ya que actúa desintegrando la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. En bacterias Gram positivas como el *Staphylococcus aureus* el timol actúa uniendo las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrogeno, cambiando las características de permeabilidad de la misma. El efecto inhibitorio del timol es mayor a un pH de 5.5 que de 6.5, ya que a bajos valores de pH la molecula del agente antimicrobiano no está disociada, logrando unir mejor las partes hidrofóbicas de las proteínas y, por lo tanto, facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana. Por lo cual es importante señalar que la acción antimicrobiana del timol es dependiente

de ciertos factores como e, tipo de microorganismo, pH del medio y temperatura de incubación.

3.4 GENERALIDADES DE LA CEPA SOMETIDA A ENSAYO ⁽¹²⁾

Género y Especie: *Streptococcus mutans*

El papel esencial de los microorganismos en la etiología de la caries fue instituido por Miller en 1890. A ello se sumó la identificación de las bacterias indicadas como las principales: el *S. mutans* por Clarke en 1924 y los *Lactobacillus* por Buntig y Palmerlee en 1925.

El *S. mutans* se encuentra en la placa bacteriana dental y se considera el patógeno más asociado con el inicio de la lesión de caries. Fitzgerald y Keyes, en 1960, identificaron a *S. mutans*, como la especie con mayor poder patogénico para iniciar la lesión de caries, en relación a otras especies acidogénicas de la placa supragingival, jugando un rol activo en el desarrollo de lesiones de caries, especialmente en las primeras etapas.

Su principal hábitat es la superficie dentaria del hombre. Se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización.

3.4.1 Morfología

Son cocos Gram (+), dispuestos en cadenas cortas de 4-6 cocos, los cuales miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro, son anaerobios facultativos, capaces de fermentar hidratos de carbono, de cuyo metabolismo deriva la producción de

ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares (7), su temperatura óptima de desarrollo es de 36 ± 1 °C.

Comprenden parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas.

Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, ya que se puede encontrar en forma de coco o de forma más alargada como bacilo (6).

3.4.2 Cultivo

El medio de cultivo Infusión de Cerebro Corazón (BHI), es el más empleado y eficaz para el cultivo de bacterias exigentes como Estreptococos, Neumococos, Meningococos y otros.

3.4.3 Características de la colonización con *S. mutans*

Acidogenicidad: El *S. mutans* puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo, esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.

Aciduricidad: Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.

Acidofilicidad: El *S. mutans* puede resistir la acidez del medio.

El *S. mutans* está relacionado con la caries que ocurren en fisuras, en superficies lisas o sobre el cuello y raíz del diente. Los altos grados de infección por *S. mutans* elevan el riesgo de padecer caries.

3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

A la luz de los modernos avances en botánica, fitoquímica, farmacología, farmacocinética, farmacodinamia y toxicología; el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser constatado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con la menor incidencia de ocasionar riesgos al paciente. Por medio de los ensayos antimicrobianos se puede evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vivo* o *in vitro* (34).

3.5.1 Concentración Inhibitoria Mínima

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado lo cual sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. La sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico, además es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas que permiten revisar los protocolos de la antibióticoterapia empírica. (22, 29, 34).

3.5.2 Reto Microbiano para la Verificación de la Eficacia Antibacteriana del Colutorio.

Esta prueba es cuantitativa y demuestra la reducción logarítmica de los microorganismos de prueba, tras la exposición a diversas concentraciones del

agente antibacteriano. El esquema de estudio implica típicamente la inoculación del agente antibacteriano con el organismo de prueba para conseguir una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/mL en puntos de tiempo seleccionados (generalmente cero, 5 y 10 min.), se retiran alícuotas de los agentes antibacterianos, se colocan en un medio de neutralización y luego en un medio de agar para fines de recuento microbiano. (6)

Las placas preparadas se incuban en condiciones específicas adecuadas para el crecimiento del organismo de prueba que se está evaluando. Después de la incubación, se recuperan colonias, se enumeran y las reducciones logarítmicas se calculan basándose en el inóculo inicial. Se recomienda la verificación de la identidad del organismo de prueba. No hay evaluación estándar de rendimiento de prueba; sin embargo, la mayoría de los protocolos diseñados por las compañías farmacéuticas requieren un mínimo de reducción de 4 log de bacterias vegetativas y hongos con el fin de demostrar propiedades bactericidas y un mínimo de reducción de 6 log en esporas bacterianas para demostrar la actividad esporicida (1, 6).

Previo a la realización de estudios de reto microbiano también se necesita verificar la idoneidad del método de recuento a través del cual se demuestra que se tiene la capacidad de recuperar el microorganismo en estudio en conteos bajos. Un protocolo de prueba de idoneidad debe imitar el método de determinación de biocarga, los tipos de medios y tampones, el número de buffer de enjuagues, así como las condiciones de incubación deben reproducirse durante la validación. A fin de demostrar que el método propuesto es capaz de recuperar los microorganismos viables que pudieran estar presentes en la muestra de producto, el protocolo del método idoneidad requiere el uso de microorganismos representativos para desafiar a los métodos de recuperación microbianas (6).

Cuando la muestra de ensayo contiene propiedades antimicrobianas, éstos deben ser eliminados por medio de dilución, lavado, filtración y/o inactivación química para asegurar una adecuada recuperación de microorganismos viables. También es parte de un método de ensayo de idoneidad, la demostración de que el método de neutralización elegido no es perjudicial o tóxico para los microorganismos y que los medios de ensayo son adecuados para la recuperación de organismos especificados bajo las condiciones de prueba dadas. Además, los controles con resultado negativo se realizan junto a las pruebas de provocación para verificar la ausencia de contaminación en los medios y en los materiales utilizados en el estudio ⁽⁶⁾.

El diseño de la prueba para evaluar la eficacia de neutralizar la toxicidad implica tres grupos de tratamiento:

1. Grupo de prueba (grupo de evaluación de la eficacia): En este grupo de tratamiento, el producto se somete al método de ensayo y luego se inoculó con organismos de ensayo especificados. La preparación del producto puede incluir una etapa de neutralización, si es necesario. Esta prueba evaluará la recuperación adecuada de microorganismos representativos de la matriz de la muestra, así como la eficacia del método de neutralización utilizado.
2. Grupo de control peptona (grupo toxicidad de evaluación / control positivo): En este grupo de tratamiento, en lugar de producto, agua de peptona u otra solución tampón se somete a la misma preparación de la muestra y el organismo desafío de inoculación utilizado para el grupo de prueba. Si el grupo de prueba se sometió a una etapa de neutralización, el grupo control peptona también debe ser sometido al mismo método de neutralización. Esta prueba es en esencia un control positivo que evalúa la recuperación de organismos de ensayo en ausencia del producto.
3. Grupo Viabilidad (verificación del contador de inóculo): En este grupo de prueba, la población de los inóculos del organismo de prueba utilizado para

desafiar los grupos 1 y 2 se verifica mediante el método de recuento en placa en ausencia del método de neutralización y el producto se está ensayando.

3.6 DEFINICIONES.

3.6.1 Aceite Esencial ⁽¹³⁾

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).

3.6.2 Colutorio ⁽¹⁸⁾

Un colutorio antiplaca o comúnmente llamado enjuague bucal, es un agente químico antimicrobiano, vehiculizado en forma líquida para poder ser utilizado en la cavidad oral. Los agente químicos antimicrobianos deben ser capaces de destruir microorganismos, inhibir su reproducción o su metabolismo. Muchos son bactericidas y alguno bacteriostáticos. El colutorio de mayor efectividad hasta el momento y aprobado por la ADA es la clorhexidina al 0.12%.

3.6.2 Sustantividad ⁽¹⁶⁾

Capacidad de un agente a unirse a distintas localizaciones de la boca, para liberarse lentamente en forma activa manteniendo niveles terapéuticos.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de graduación es de carácter Experimental y Prospectivo Experimental: porque se realizaron diferentes pruebas microbiológicas como; La concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de orégano de origen comercial; adecuabilidad del método de recuento y eficacia antibacteriana a los colutorios de aceite esencial de orégano al 0.05 % y 0.10 % (p/v) frente a *Streptococcus mutans*. Además se compararon los resultados con un colutorio de gluconato de clorhexidina al 0.12 % (CHX); en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Prospectivo: Porque quedará un antecedente del estudio de la actividad antibacteriana realizada a una muestra comercial de aceite esencial de orégano y a formulaciones de colutorios de aceite esencial de orégano al 0.05 % y 0.10 % (p/v) como estudios in vitro que puedan apoyar futuras investigaciones con otros aceites esenciales y otros microorganismos a nivel clínico.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La investigación bibliográfica se realizó a través de la lectura de: Libros, trabajos de investigación, revistas, información de internet; con la finalidad de sustentar teóricamente el documento de investigación. Se realizó en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

- Consorcio de Bibliotecas Universitarias de El Salvador (CBUES)
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

La realización del estudio se llevó a cabo empleando como muestra los colutorios de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. formulados y elaborados por estudiantes de la Licenciatura en Química y Farmacia en el laboratorio de la cátedra de Tecnología Farmacéutica de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, como parte de un proyecto multidisciplinario, con los estudiantes de la Facultad de Odontología de la misma universidad quienes lo someterán a estudios clínicos fase I con el fin de evaluar su utilización como una alternativa viable y segura en el tratamiento de las enfermedades bucodentales como la gingivitis.

Ambos colutorios se formularon con los mismos excipientes, cambiando únicamente la concentración del aceite esencial de orégano, un colutorio se formuló a una concentración de 0.05% y el otro colutorio a una concentración de 0.10% de aceite esencial de orégano de origen comercial, dichas concentraciones fueron elegidas después de hacer ensayos de tolerancia del sabor del aceite esencial de orégano, en el Tabla N° 1 se enlistan las materias primas o excipientes de ambos colutorios.

Tabla N°1 Composición química del colutorio de aceite esencial de *O. vulgare* L. al 0.05 %y 0.10 %

MATERIA PRIMA O EXCIPIENTE	Colutorio 0.05 % (% p/v)	Colutorio 0.1 % (% p/v)	Función en la formulación
Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L.	0.05	0.10	Principio activo: antibacteriano y antiinflamatorio
Propilenglicol	10.0 – 13.0	10.0 – 13.0	Codisolvente
Glicerina	10.0 – 13.0	10.0 – 13.0	Codisolvente
Sacarina sódica	0.05 – 0.10	0.05 – 0.10	Edulcorante
Citrato de sodio	0.05 – 0.10	0.05 – 0.10	Regulador de pH
Polisorbato 80	0.80 – 1.50	0.80 – 1.50	Agente tesioactivo
Metilparabeno	0.18 – 0.20	0.18 – 0.20	Preservante antimicrobiano
Propilparabeno	0.01 - 0.02	0.01 - 0.02	Preservante antimicrobiano
Color verde hidrosoluble	0.4 – 0.5	0.4 – 0.5	Correctivo de color
Agua purificada c.s.p.	100 .00	100 .00	Vehículo acuoso

Mecanismo de acción de los metabolitos activos del AEO ⁽⁸⁾.

El Carvacrol y Timol son los principios activos presentes en el AEO los cuales actúan desintegrando la membrana externa de las bacterias Gram negativas y Gram Positivas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas, provocando la muerte bacteriana.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, Universidad de El Salvador y en el Laboratorio de la Cátedra de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Primero se realizaron pruebas de solubilidad del aceite esencial de orégano con diferentes solventes y solubilizantes para poder incorporarlo en el medio de cultivo utilizado en la determinación de la concentración inhibitoria mínima.

También se trabajó en la reanimación y estandarización de la cepa de trabajo para realizar las pruebas de identidad y pureza de la cepa *S. mutans* ATCC 25175. Luego de identificada la cepa y haber sido estandarizados los inóculos de trabajo se procedió a realizar el ensayo de CIM al aceite esencial de orégano el cual se realizó mediante el método de microdilución en caldo ⁽²⁹⁾.

Además, se realizó la prueba de adecuabilidad del método de recuento al colutorio de aceite esencial de orégano al 0.10 %, vehículo y colutorio de CHX con el fin de demostrar que el método propuesto es capaz de recuperar los microorganismos viables que pudieran estar presentes en la muestra de los productos anteriormente mencionados y seleccionar el neutralizante que inactiva la acción antimicrobiana de los preservantes, del CHX y del aceite esencial de orégano sin ser perjudicial para el microorganismo inoculado. Una vez seleccionado el neutralizante se procedió a realizar la determinación de la eficacia antibacteriana in vitro de ambos colutorios de aceite esencial de orégano, del vehículo y del colutorio de CHX sobre el *S. mutans* ATCC 25175.

4.4.1 Realización del ensayo CIM del aceite esencial de *O. vulgare* L. sobre *S. mutans* ATCC 25175.

Para realizar el ensayo CIM primero se hicieron pruebas de solubilidad del AEO, identificación de la cepa y preparación de los inóculos de trabajo de esta.

4.4.1.1 Pruebas de solubilidad del aceite esencial de orégano

Debido a la naturaleza fisicoquímica del aceite esencial de orégano, fue necesario realizar pruebas de solubilidad para poder incorporarlo en el medio de cultivo en el que se realizaría el ensayo CIM, para ello se probó su solubilidad en los solventes reportados en la Tabla N° 2.

Estos solventes fueron seleccionados con base a los ensayos de solubilidad que se le realizaron a las formulaciones de los colutorios, y las cantidades de aceite esencial de orégano (AEO) son proporcionales a la solución stock del ensayo CIM.

Tabla N° 2. Solventes y solubilizantes seleccionados para incorporar el AEO

SOLVENTE	CANTIDAD	
	SOLVENTE	AEO
-Polisorbato 20	0.791 g	0.103 g
-Agua purificada	10.501 g	(0.90 %)
-Polisorbato 60	0.426 g	0.104 g
-Agua purificada	11.301 g	(0.87 %)
-Polisorbato 80	0.362 g	0.109 g
-Agua purificada	10.273 g	(1.01%)
-Dimetilsulfóxido (DMSO)	1.500 g	0.102 g
-Agua purificada	10.024 g	(0.87 %)
-Solución de lauril sulfato de sodio al 10%	12.800 g	0.642 g
-Propilenglicol	0.642 g	(4.55 %)
-Solución de LSS 10%	9.611 g	0.641 g
-Propilenglicol (PPG)	0.651 g	(5.88 %)
-Solución de LSS 10%	12.800 g	0.641 g (4.77 %)
-Solución de LSS 10%	4.203 g	0.218 g
-PPG	0.217 g	(2.46 %)
-Caldo Müeller Hinton (CMH) + (DMSO) 0.5 %	4.202 g	

4.4.1.2 preparación de los inóculos de trabajo de *S. mutans* ATCC 25175 (Figura No 3) ⁽²⁹⁾

Previo a la realización de ésta parte del trabajo fue necesario la reanimación de la cepa de prueba y la verificación de su identidad de acuerdo a lo descrito a continuación.

Para la reanimación de la cepa se siguieron las indicaciones del proveedor:

1. Inocular 10 placas de Agar Müller Hinton (AMH) enriquecido con 5% de sangre desfibrinada (Ver Anexos N° 3) de carnero con un cultivo puro procedente de liofilizado de *S. mutans* ATCC 25175, emplear la técnica de estriado continuo. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas en un desecador sometido a la combustión de una vela.
2. Recoger el crecimiento de ocho de las placas con un asa bacteriológica estéril y transferir a un tubo de ensayo con rosca con 2 mL de solución salina estéril y agitar en vórtex durante un minuto la suspensión. (almacenar las placas restantes en refrigeración).
3. Transferir 200 μL de la suspensión de *S. mutans* ATCC 25175 preparada en el paso anterior, a 10 crioviales (tubos eppendorf de 1.5 mL) con 200 μL glicerina 40% estéril, agitar en vórtex por 1 min, refrigerar entre -10°C y -4°C .

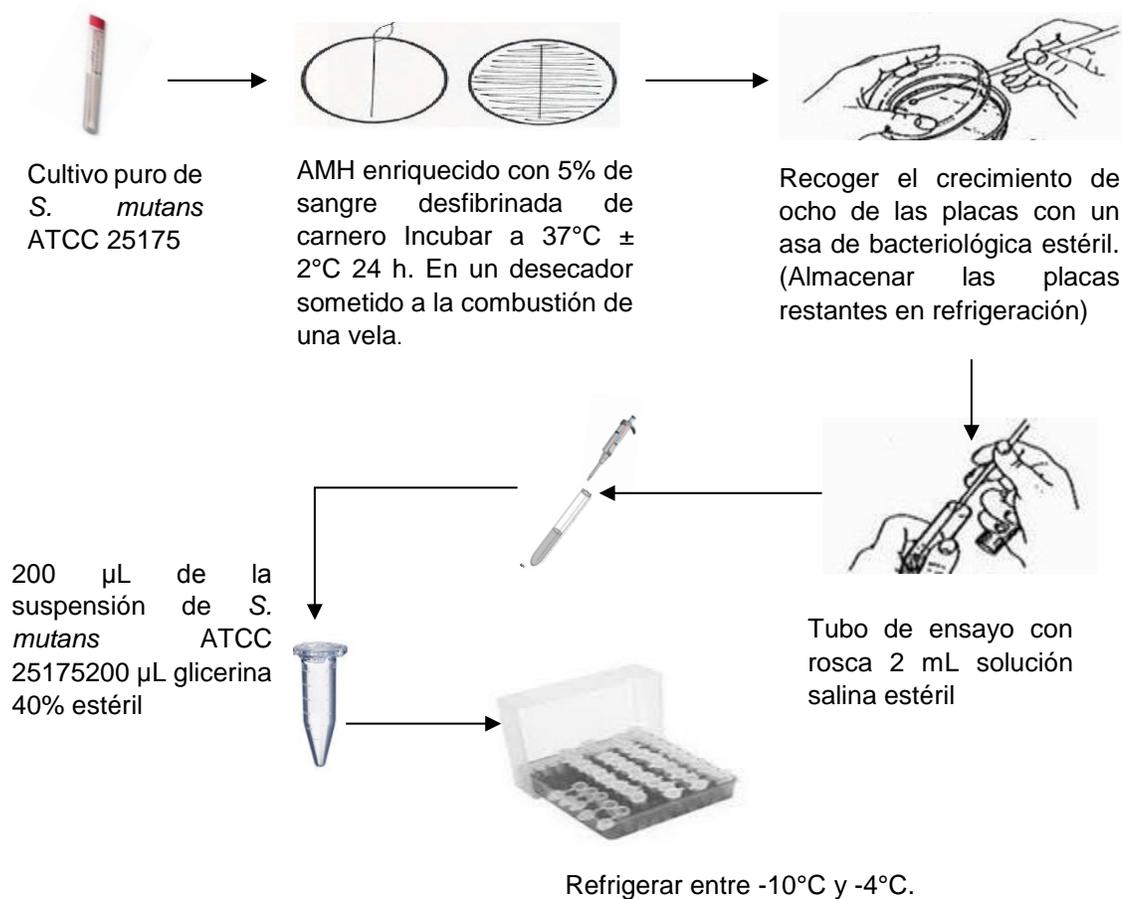


Figura N° 3. Esquema de reanimación de la cepa *Streptococcus mutans*

4.4.1.3 Identificación de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ⁽¹¹⁾

Antes de proceder a las pruebas microbiológicas del aceite esencial de orégano y de los colutorios, se verificó la identidad de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 utilizada, para ello se realizaron pruebas las cuales que se resumen en el siguiente cuadro N° 3. Procedimiento de las pruebas en Anexo N°4

Cuadro N° 3. Pruebas de identificación de *S. mutans* ATCC 25175 ⁽¹¹⁾.

PRUEBA	RESULTADO ESPERADO
Tinción Gram	Cocos en cadena Gram (+)
Catalasa	Negativo
Oxidasa	Negativo
Voges-Proskauer	Positivo
Crecimiento en NaCl 6.5 %	Negativo

Comparar resultados obtenidos con los resultados reportados en el certificado de análisis de la cepa de *Streptococcus mutans* (Anexo N° 5) y con la bibliografía consultada.

4.4.1.4 Realización del ensayo CIM ⁽²⁹⁾

Para determinar la calidad del aceite esencial de orégano de origen comercial utilizado como materia prima para la elaboración de los colutorios, se verifica su actividad antibacteriana a través de la determinación de la CIM sobre *S. mutans*. La prueba se realizó mediante el MÉTODO MICRODILUCIÓN EN CALDO, método oficial descrito en por los investigadores Irith Wiegand et al (2008) en Nature Protocols.

Para la realización de esta prueba se ejecutaron 3 procedimientos principales:

- A. Preparación de solución Stock de aceite esencial de orégano (AEO).
- B. Preparación de cultivos estandarizados de trabajo.
- C. Realización del ensayo de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

A. Preparación de solución Stock de aceite esencial de *O. vulgare* L. (AEO) al 6.4 % (p/v) y diluciones de trabajo. (Anexo N° 6)

1. Diluir 1.6 g de AEO en 25.0mL de Caldo Müller Hinton CMH para obtener una solución al 6.4% con el diluyente seleccionado en la prueba preliminar de solubilidad.
2. Se prepararon 10 diluciones de prueba con concentraciones de 0.0025 % (p/v) hasta 0.64 % (p/v) de acuerdo a lo que se indica en la Tabla N° 3.

Tabla N° 3. Preparación de diluciones pruebas del aceite esencial de AEO para ensayo de CIM sobre *S. mutans* ATCC 25175.

Etapa	Concentración de la dilución de AEO % (p/v)	Origen	Vol. de solución stock o de dilución de AEO (mL)	Vol. de BHI estéril (mL)	concentración 1 % (p/v)	Concentración 2 % (p/v)
E1	6.4	Stock	1	9	0.64	0.32
E2	0.64	E. 1	1	3	0.16	0.08
E3	0.64	E. 1	1	4	0.128	0.064
E4	0.64	E. 1	1	7	0.08	0.04
E5	0.08	E. 4	1	1	0.04	0.02
E6	0.08	E. 4	1	3	0.02	0.01
E7	0.08	E. 4	1	7	0.01	0.005
E8	0.01	E. 7	1	1	0.005	0.0025
E9	0.01	E. 7	1	3	0.0025	0.0012
E10	0.0025	E. 9	1	1	0.0012	0.0006
E11	0.0025	E. 9	1	3	0.0006	0.0003

Nota: Preparar las soluciones de trabajo el mismo día del análisis. E1 sólo se utilizó para realizar la primera dilución de la solución Stock.

La concentración 1 de las diluciones de prueba de AEO reportadas en la Tabla N° 4 están preparadas de tal manera que estas sean el doble de la concentración 2 que quedará en los pocillos de la microplaca.

B. Preparación de cultivos estandarizados de trabajo ⁽²⁹⁾

1. Inocular una placa de AMH con la suspensión de uno de los crioviales preparados en la realización de los inóculos de trabajo, mediante la técnica de estriado en cuadrantes. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. en un desecador bajo combustión de una vela.
2. Tomar de 3-4 colonias de morfología similar y suspender en tres tubos con 3.0 mL de caldo Brain, Heart, Infusion (BHI) e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.
3. Recoger el crecimiento de los tres tubos en un tubo de ensayo estéril con rosca (rotular como cultivo de toda la noche) y agitar en vortex durante 3 minutos. A partir de esta suspensión realizar diluciones apropiadas y leer en espectrofotómetro la absorbancia a 550 nm; hasta obtener una densidad óptica entre 0.1-0.3 unidades de absorbancia.
4. Se asume que está suspensión tiene una concentración de 10^8 UFC/mL. Sin embargo, para verificar este dato realizar diluciones seriadas 1:10 en BHI hasta la dilución 10^{-7} , e inocular en placa vertida 100 μL de las últimas cuatro diluciones en AMH por duplicado, incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h bajo combustión de una vela.
5. Contar las colonias en las placas tomando en consideración solo aquellas que presenten crecimiento entre 30 - 300 colonias para confirmar la densidad bacteriana de la suspensión estandarizada y el dato obtenido en la estandarización. (Repetir el ensayo tres veces para mayor confiabilidad de los resultados)

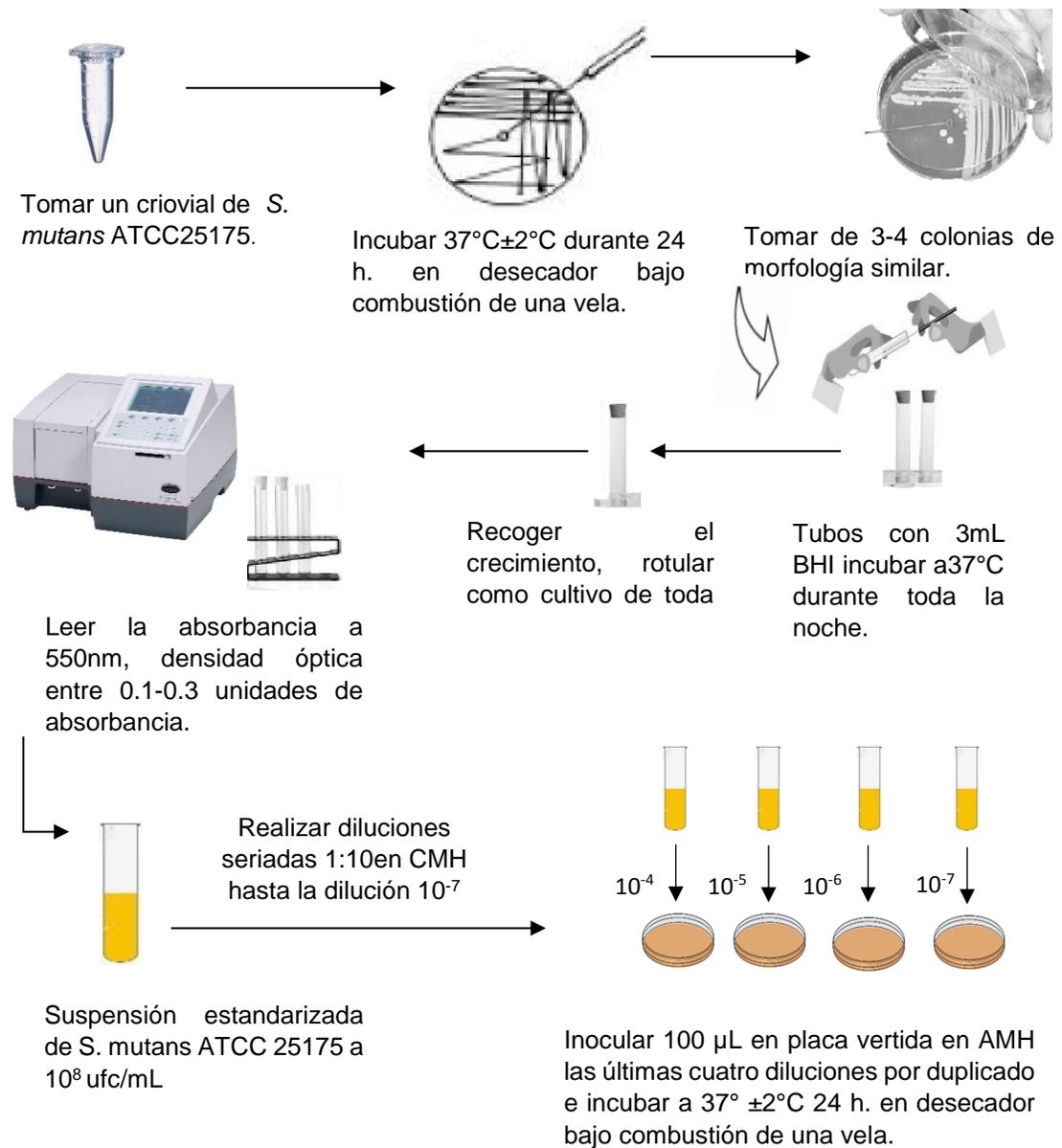


Figura N° 4. Esquema de preparación de cultivos estandarizados de trabajo

C. Realización del ensayo CIM ⁽²⁹⁾

1. Retirar una placa de microdilución de 96 pocillos de su embalaje estéril. Si la placa no se suministra con una tapa, tapar con otra placa de microdilución estéril o limpia con etanol al 70% en la parte inferior.
2. Rotular las columnas número 1 hasta la 10 de la placa de microdilución de 96 pocillos estériles con la respectiva concentración de cada dilución del AEO.
3. Transferir 50 μ L de cada dilución de AEO a los pocillos de las filas A hasta la fila H de la placa de microdilución y de las columnas 1 hasta la columna 10.
4. Mezclar la suspensión bacteriana ajustada a 1×10^8 UFC/mL mediante agitación con vórtex y diluir 1:100 añadiendo 200 μ L de suspensión bacteriana a 19.8 mL de CMH en un erlenmeyer estéril de 50 mL para preparar un inóculo de 20 mL, mezclar bien. (concentración aproximada 1.5×10^6 UFC/mL), a esta suspensión se la llamará Suspensión de Prueba.
5. Inocular la placa de microdilución que contiene las diluciones de AEO en los pocillos de las filas A, C, E y G (columnas 1-10) con 50 μ L de la suspensión de prueba.
6. Adicionar en los pocillos de las filas B, D, F y H (columnas 1-10) 50 μ L de caldo BHI estéril.
7. Adicionar en los pocillos de la columna 11, 50 μ L de caldo BHI estéril más 50 μ L de suspensión de prueba (control de crecimiento).
8. Adicionar 100 μ L de CMH estéril en cada pocillo de la columna 12 para control de esterilidad.
9. Retirar una muestra de 10 μ L desde el control de crecimiento (columna 11) inmediatamente después de la inoculación de la placa y pipetear la muestra en un tubo Eppendorf estéril conteniendo 990 μ L de CMH (Dilución 1:100). Mezclar bien en vórtex. Hacer una dilución adicional de esta suspensión pipeteando 100 μ L a 900 μ L de CMH (Dilución 1:1000) y mezclar bien en vórtex por 1 min.

10. Inocular mediante placa vertida con agar nutritivo por duplicado 100 μ L de cada una de las dos diluciones del paso 9.
11. Leer la turbidez de la placa de microdilución de 96 pocillos en espectrofotometría a 630 nm antes de incubar.
12. Incubar la placa de microdilución y las placas de agar a 37 °C durante 24-48 h. en desecador bajo combustión de una vela.
13. Después de la incubación realizar las lecturas de las microplacas de 96 pocillos en espectrofotometría a 630 nm.
14. Hacer la lectura visual de la presencia o ausencia de crecimiento, adicional a la lectura espectrofotométrica.

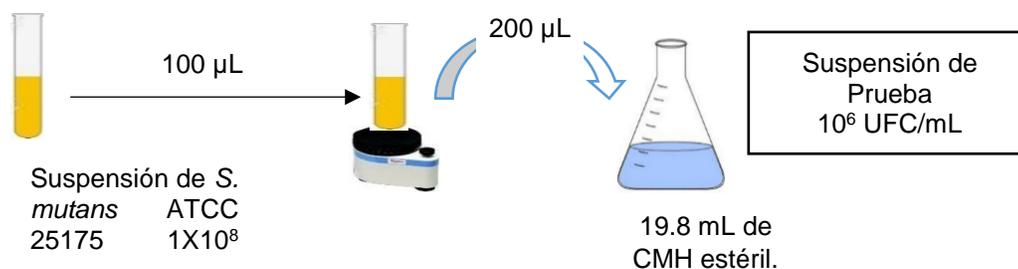


Figura N° 5. Esquema de la preparación de la suspensión de prueba de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 para el ensayo

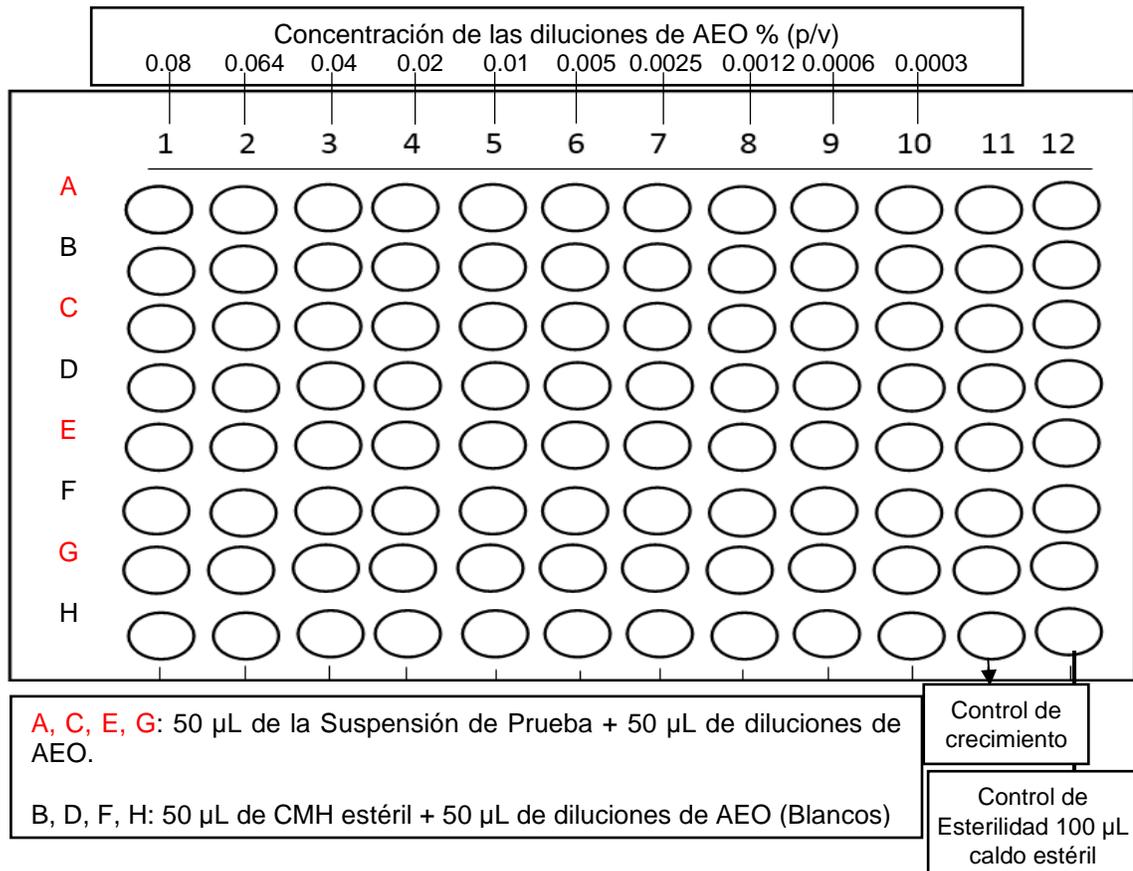


Figura N° 6. Esquema de distribución de las soluciones en la microplaca para la determinación de la CIM

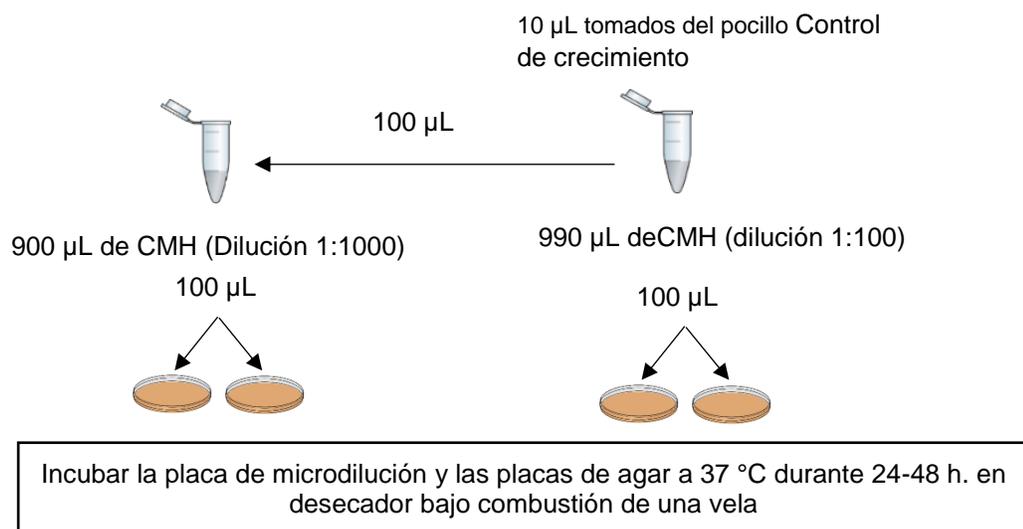


Figura N° 7. Esquema de la verificación de inoculo en microplaca

4.4.2 Determinación de la adecuabilidad del método de recuento ⁽⁶⁾

Esta prueba consiste en determinar el neutralizante idóneo para inactivar la actividad antibacteriana de los componentes del producto de prueba.

La prueba se realizó en los siguientes productos:

- Colutorio De AEO Al 0.10%,
- Vehículo
- Colutorio De CHX 0.12%

Neutralizante seleccionado: Tween 80 al 1%

1. Identificar 5 frascos en el siguiente orden:

- Al frasco con el colutorio con AEO al 0.10 % identificar como Grupo de prueba 1A (para evaluar la recuperación de la bacteria en ensayo en presencia del producto a ensayar). También realizar con vehículo (Grupo de prueba 1B) y con el colutorio de CHX (Grupo de prueba 1C)
- A un frasco con 100 mL de Agua peptonada identificar como Grupo N°2: Grupo control peptona.
- Identificar otro frasco con agua peptonada como Grupo N°3: Grupo de viabilidad

2. Tomar 10 mL del contenido de cada uno de los frascos del Grupo de Prueba y transferir cada uno a un erlenmeyer conteniendo 90 mL de diluyente (Casoy + Tween 80 al 1%) respectivamente, después inocular cada erlenmeyer con 1 mL de la suspensión de *S. mutans* ATCC 25175 a una concentración de 1×10^4 UFC/mL de tal forma que la concentración final en cada Erlenmeyer sea de 1×10^2 UFC/mL, agitar con vortex.

3. Tomar por duplicado 1 mL de cada erlenmeyer del paso anterior e inocular en las placas, agregar aproximadamente 20 mL de agar nutritivo e incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en desecador sometido a combustión de una vela por 72 horas (3 días).

4. Tomar 10 mL del contenido del frasco del Grupo Control y transferir a 1 erlenmeyer conteniendo 90 mL de diluyente (Casoy + Tween 80 al 1%), e inocular con 1 mL de la suspensión de *S. mutans* ATCC 25175 a una concentración de 1×10^4 UFC/mL agitar con vortex.
5. Tomar por duplicado 1 mL del erlenmeyer del paso anterior e inocular en las placas, agregar aproximadamente 20 mL de agar nutritivo e incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en desecador sometido a combustión de una vela por 72 horas (3 días).
6. Tomar 10 mL del contenido del frasco del Grupo Viabilidad y transferir a 1 erlenmeyer conteniendo 90 mL de diluyente sin neutralizante (Casoy) e inocular con 1 mL de la suspensión de *S. mutans* ATCC 25175 a una concentración de 1×10^4 UFC/mL agitar con vortex.
7. Tomar por duplicado 1 mL del erlenmeyer del paso anterior e inocular en las placas, agregar aproximadamente 20 mL de agar nutritivo e incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en desecador sometido a combustión de una vela por 72 horas (3 días).
8. Hacer el recuento de las colonias observadas después de la incubación, promediar los datos obtenidos de cada uno de los grupos ensayados (Grupos de Prueba, Grupo Control y Grupo de Viabilidad).

Para que la prueba sea considerada válida se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. El cociente del recuento del grupo de prueba entre el grupo control peptona debe ser mayor a 0.5
2. El cociente del recuento del grupo de control peptona entre el grupo viabilidad peptona debe ser mayor a 0.7

De no cumplirse las condiciones anteriores deben evaluarse modificaciones al neutralizante o a la dilución inicial.

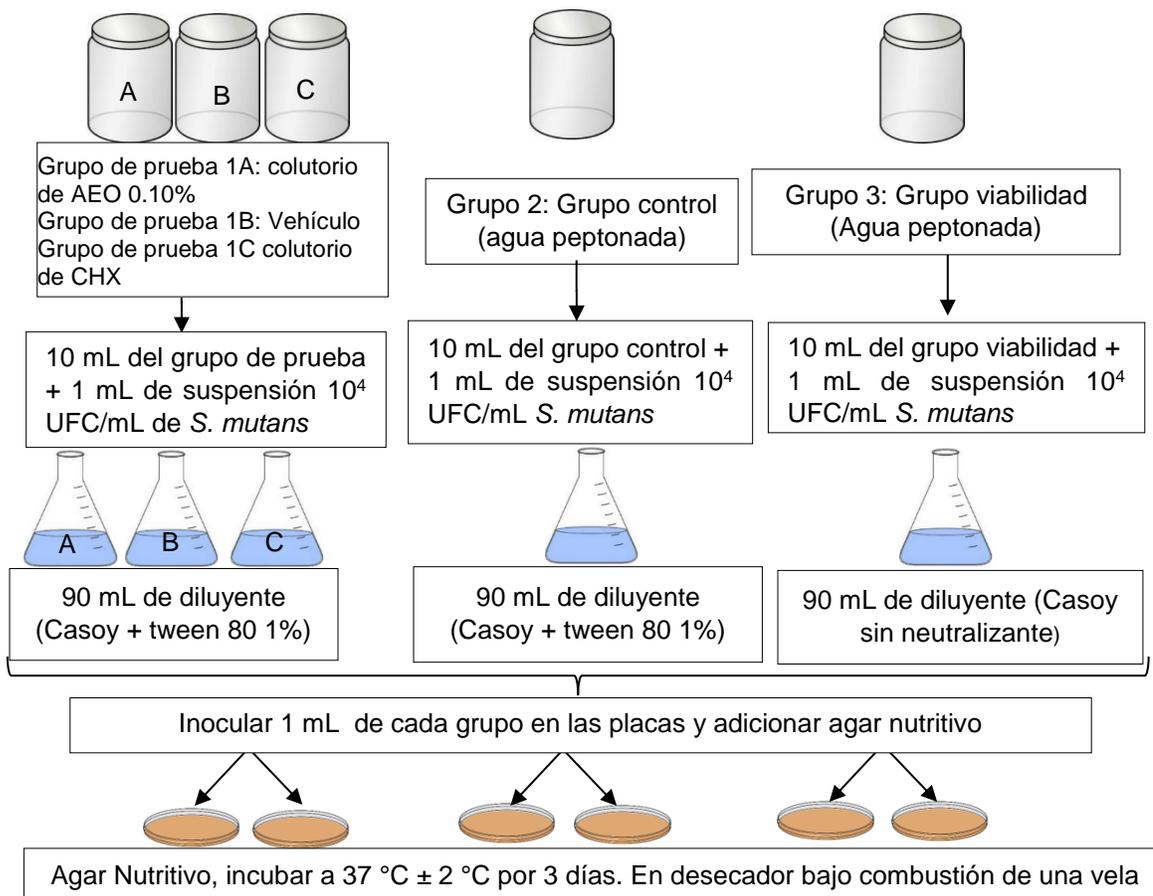


Figura N° 8. Esquema de Adecuabilidad del Método de Recuento

4.4.3 Determinación de la eficacia antibacteriana In Vitro (1, 6)

Luego de determinar la concentración inhibitoria mínima del AEO y después de haber demostrado la adecuabilidad del método de recuento en las soluciones a ensayar, se procederá a determinar la eficacia antibacteriana in vitro mediante el método de dilución en placa de la AOAC.

1. Preparar la suspensión de prueba *S. mutans* ATCC 25175 como se determinó en la sección B del ensayo CIM (concentración de 10^8 UFC/mL.)

2. En cada ensayo verificar el recuento de la suspensión de prueba mediante diluciones seriadas y recuento en placa vertida con agar nutritivo.
3. A 60 mL de colutorio de AEO al 0.05% (p/v) agregar 0.6 mL de la suspensión de prueba (10^8 UFC/mL de *S. mutans* ATCC 25175), agitar completamente después de la adición.
4. Transcurridos los tiempos seleccionados (30 segundos, 1, 5, 10, 15 y 30 min) a partir de la inoculación de la suspensión de prueba en el producto, hacer diluciones seriadas 1:10 en el diluyente seleccionado en la prueba de adecuabilidad hasta llegar a la dilución 10^{-5} , mezclar bien y luego transferir 1 mL por duplicado de cada una de las diluciones a placas estériles y añadir 20 mL de Agar Nutritivo, homogenizar apropiadamente, dejar solidificar.
5. Incubar las todas las placas a 37 °C durante 24-48 horas.
6. Leer las placas y realizar los cálculos de densidad celular en cada tiempo de muestreo.
7. Con los datos obtenidos elaborar gráficos de Densidad celular (ufc/mL) versus tiempo.
8. Repetir todo el procedimiento con el colutorio de AEO al 0.01 %, el vehículo y con un colutorio de Clorhexidina al 0.12%.

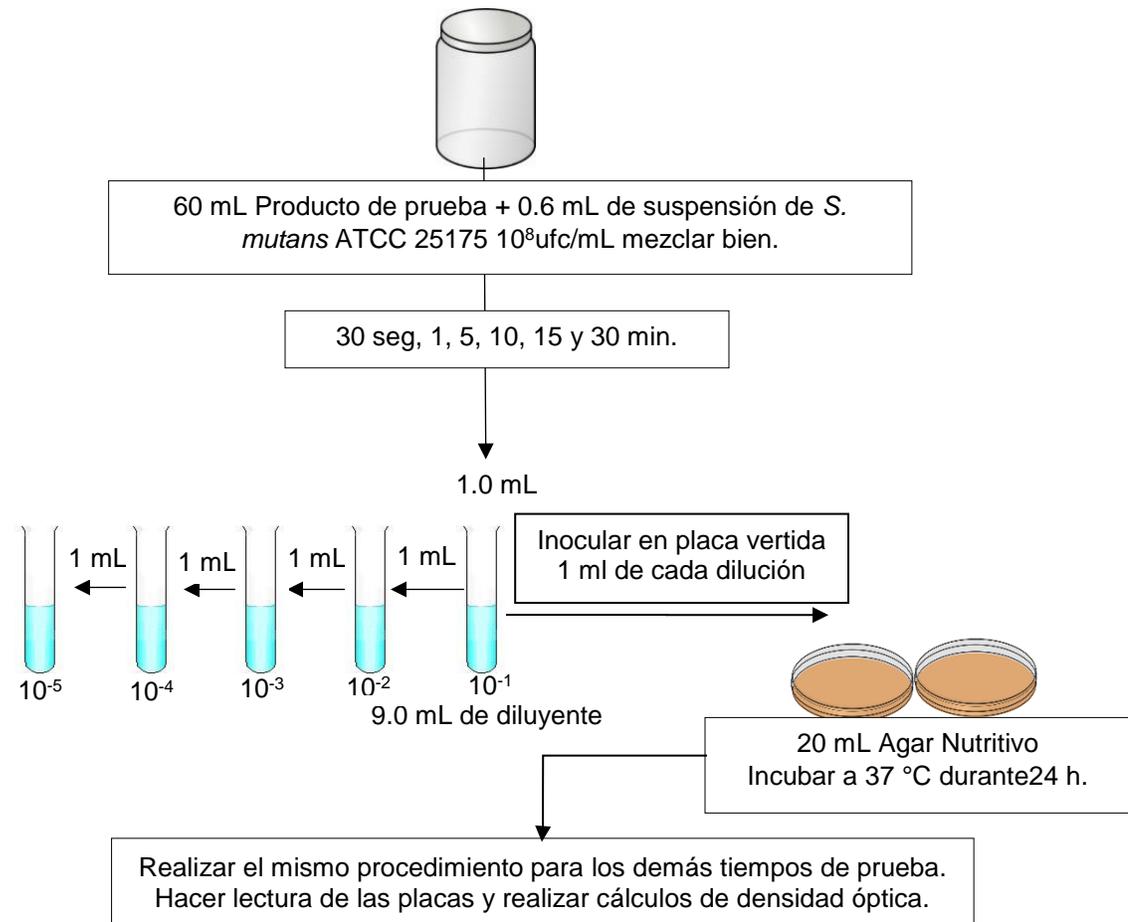


Figura N° 9. Esquema de la determinación de la eficacia antimicrobiana ^(1,6)

Los esquemas fueron elaborados con base a la información obtenida en la bibliografía consultada.

CAPITULO V
RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 REALIZACIÓN DEL ENSAYO CIM DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Sobre *S. Mutans*

La realización de este ensayo constó de los siguientes procedimientos:

- Prueba de solubilidad del AEO
- Preparación del inculo: reanimación, identidad y estandarización de la cepa
- Preparación de diluciones de trabajo
- Determinación de CIM

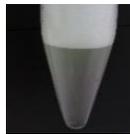
5.1.1 Pruebas de solubilidad del aceite esencial de *O. vulgare* L.

Esta prueba se realizó porque en la bibliografía consultada no se encontró la información con respecto a la solubilidad del aceite esencial de orégano por lo tanto se decidió realizar ensayos en diferentes solventes y los resultados se muestran en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4: Resultados de solubilidad del AEO

SOLVENTE	CANTIDAD		RESULTADO	DESCRIPCIÓN
	SOLVENTE	AEO		
-Polisorbato 20 -Agua purificada	0.791 g 10.501 g	0.103 g (0.90 %)		Solución blanquecina opaca
-Polisorbato 60 -Agua purificada	0.426 g 11.301 g	0.104 g (0.87 %)		Solución blanquecina opaca
Polisorbato 80 -Agua purificada	0.362 g 10.273 g	0.109 g (1.01%)		Solución blanquecina opaca

Tabla N° 4. Continuación

DMSO Agua purificada	1.500 g 10.024 g	0.102 g (0.87 %)		Solución blanquecina opaca con presencia de precipitado
Solución de lauril sulfato de sodio al 10% Propilenglicol	12.800 g 0.642 g	0.642 g (4.55 %)		Solución transparente
Solución de lauril sulfato de sodio al 10% Propilenglicol	9.611 g 0.651 g	0.641 g (5.88 %)		Solución amarilla transparente
Solución de lauril sulfato de sodio 10%	12.800 g	0.641 g (4.77 %)		Solución transparente
Solución de lauril sulfato de sodio 10% Propilenglicol Caldo Müeller Hinton + dimetilsulfóxido 0.5 %	4.203 g 0.217 g 4.202 g	0.218 g (2.46 %)		Solución blanca opaca con sobrenadante

Las pruebas de solubilidad realizadas resultaron en soluciones turbias con los siguientes solubilizantes; Polisorbato 20, Polisorbato 60, Polisorbato 80 y DMSO lo cual indica que no es posible incorporar el aceite esencial de orégano en el agua utilizando esos solubilizantes a las concentraciones estudiadas concentraciones. Finalmente en la prueba con la solución de lauril sulfato de sodio al 10% y propilenglicol se obtuvo una solución transparente amarillenta, que aparentemente no altera el color original del aceite esencial de orégano y que constituyó una prueba de solubilidad exitosa en esos diluyentes.

Por lo tanto de acuerdo con los resultados obtenidos la mejor combinación fue la solución de lauril sulfato de sodio y Propilenglicol ya que con esta se conservan las propiedades físicas del AEO y se pudo observar que el aceite se incorporó totalmente en el Caldo Müeller Hinton. Para una mejor incorporación se preparó

una solución de lauril sulfato de sodio al 12% más 6.4% de propilenglicol debido a que a esta concentración es más fácil incorporar el aceite en el diluyente del medio de cultivo.

5.1.2 Preparación del inóculo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

-Reanimación de la cepa

Después de sembrar en las placas el *S. mutans* se obtuvo un crecimiento abundante y se almacenó en crioviales preparados como se indica en la metodología, luego de realizar estos crioviales se tomó un criovial y se sembró en AMH y se observó que no hubo crecimiento después de incubar en las condiciones antes mencionadas en metodología.

Por lo tanto se tomó la decisión de inocular 300 µL de cada criovial en tres tubos cada uno con caldo BHI, Tioglicolato y Casoy. Se incubaron los tres tubos bajo las mismas condiciones, luego de incubar se observó que únicamente había crecimiento en caldo BHI, lo cual llevo a tomar la decisión de cambiar el medio de almacenamiento de solución salina a caldo BHI + 5% de glicerina. El crecimiento de 8 placas de *S. mutans* se colocó en 6.5 mL de caldo BHI + 5% de glicerina, se almacenaron alícuotas de 600 µL de este tubo a tubos Eppendorf de 1.5 mL + 100 µL de aceite mineral estéril para generar un medio de anaerobiosis y mantener en óptimas condiciones el inóculo de *S. mutans*, luego se colocaron en congelación entre -30 y -40 °C.

-Identificación de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175

De acuerdo con los resultados reportados en el cuadro N° 4 se confirmó que la cepa estudiada se trata de *Streptococcus mutans*, ya que coincidieron con los resultados reportados en el certificado de análisis (ANEXO N° 6) y con la bibliografía consultada ⁽¹¹⁾.

Cuadro N° 4. Resultado de las pruebas de identificación del *S. mutans*

PRUEBA REALIZADA	RESULTADO ESPERADO	RESULTADOS OBTENIDOS
Tinción Gram	Cocos Gram (+)	CONFORME
Catalasa	Negativo	CONFORME
Oxidasa	Negativo	CONFORME
Voges Proskauer	Positivo	CONFORME
Crecimiento en NaCl 6.5 %	Negativo	CONFORME
Hemólisis	Hemólisis (γ)	CONFORME

- Estandarización de la cepa o cultivos de trabajo.

En un ensayo preliminar de estandarización cultivando la cepa de estudio en CMH se observó un crecimiento demasiado bajo, por lo que se decidió hacer los tres ensayos con el medio BHI anteriormente seleccionado para conservación, por poseer mejores nutrientes para el crecimiento de bacterias exigentes como el *S. mutans* (13).

En los siguientes ensayos con caldo BHI se obtuvieron los resultados reportados en el Tabla N° 5.

Para el recuento microbiano sólo se tomaron en cuenta las placas conteniendo entre 30 y 300 colonias, para determinar el número de UFC/mL en la suspensión estandarizada se aplicó la siguiente formula (29):

$$N = \frac{C \times 10}{10^{-D}}$$

Donde:

C: Número colonias por placa

N: UFC/mL

D: Número de dilución 1:10

Se multiplica por 10 porque la cantidad del inóculo en la placa era de 100 µL, la décima parte de 1 mL.

Tabla N° 5. Resultados de ensayo de estandarización de *S. mutans*

Dilución	Ensayo 1					
	Absorbancia de suspensión: 0.117					
	Placa vertida			Placa esparcida (No se Realizó)		
	Conteo en Placa	Promedio	UFC/mL	Conteo en Placa	Promedio	UFC/mL
10 ⁻⁴	MNPC	-----	-----	-----	-----	-----
10 ⁻⁵	MNPC	-----	-----	-----	-----	-----
10 ⁻⁶	64	75	7.5X10 ⁸	-----	-----	-----
10 ⁻⁶	86			-----		
10 ⁻⁷	6	8	8X10 ⁸	-----	-----	-----
10 ⁻⁷	10			-----		
Dilución	Ensayo 2					
	Absorbancia de suspensión: 0.106					
	Placa vertida			Placa esparcida		
	Conteo en Placa	Promedio	UFC/mL	Conteo en Placa	Promedio	UFC/mL
10 ⁻⁵	104	118	1.18X10 ⁸	81	79	7.9X10 ⁷
10 ⁻⁵	131			76		
10 ⁻⁶	13	14	1.4X10 ⁸	7	8	1.4X10 ⁷
10 ⁻⁶	15			9		
10 ⁻⁷	1	2	2X10 ⁸	1	2	2X10 ⁸
10 ⁻⁷	3			3		
Dilución	Ensayo 3					
	Absorbancia de suspensión: 0.106					
	Placa vertida			Placa esparcida		
	Conteo en Placa	Promedio	UFC/mL	Conteo en Placa	Promedio	UFC/mL
10 ⁻⁵	68	79	7.9X10 ⁷	95	105	1.06X10 ⁸
	89			115		
10 ⁻⁶	7	9	9.0X10 ⁷	15	12	1.2X10 ⁸
	11			8		
10 ⁻⁷	1	1	1X10 ⁸	1	1	1X10 ⁸
	1			1		

Ejemplo de cálculo para determinar cantidad real de UFC/mL en suspensión estandarizada aproximadamente 10^8 UFC/mL de *S. mutans* tomando en cuenta los resultados del recuento en placa de la dilución 10^{-6}

$$N = \frac{75 \text{ colonias} \times 10}{10^{-6}} = 7.5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$$

El primer ensayo se realizó separadamente del segundo y tercero y no se aplicó el método de placa esparcida. Los últimos ensayos se realizaron simultáneamente y se inocularon solamente las últimas 3 diluciones seriadas por cuadruplicado, dos placas de cada dilución se inocularon por método de placa vertida y las otras dos por método de esparcido en placa con varilla de vidrio en L, los resultados de estos ensayos están reportados en la tabla N° 5.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos se puede observar que en todos los casos la suspensión estandarizada de *S. mutans* presentó un recuento aproximado de 10^8 UFC/mL cuando se estandarizó a una longitud de onda de 550 nm y aproximadamente 0.106 unidades de absorbancia. Se decidió dejar las unidades de absorbancia entre 0.135-0.145 debido a que hay datos que muestran que a una absorbancia de 0.106 y 0.117 el inóculo de prueba sigue siendo en el rango menor de 10^8 UFC/mL. También se observó que el método con el que se obtuvo un mejor recuento es el de placa vertida.

5.1.4 Preparación de solución Stock de AEO

Cuando se preparó la solución Stock de AEO en el caldo BHI, se observó que el aceite de orégano no se incorporaba en el medio y el resultado fue una solución turbia, indicando insolubilidad. Se decidió sustituir el medio de cultivo sólo por uno que incorporara lauril sulfato de sodio al 12% + 6.4% de propilenglicol estéril y que permitiera preparar la solución Stock de AEO al 6.4% y las diluciones de

trabajo de AEO, en caldo BHI. En la tabla N° 6 se muestran los resultados del ensayo de solubilidad del aceite esencial de orégano en caldo BHI. A esta solución Stock se denomina E1, de la cual se tomaron alícuotas y se diluyeron con caldo BHI para preparar las demás soluciones de prueba.

Tabla N° 6. Ensayo de solubilidad del AEO en caldo BHI

MEDIO	CANTIDAD		RESULTADO
	DISOLVENTE	AEO	
25 mL de caldo BHI	4 g LSS 1.6 g PPG	1.6 g (6.4 %)	Solución lechosa con viscosidad moderada
3 mL de caldo BHI	0.331 g LSS 0.192 g PPG	0.192 g (6.4 %)	Solución lechosa con viscosidad moderada
25 mL de caldo BHI	2 g LSS 1.6 g PPG	1.6 g (6.4%)	Solución lechosa con viscosidad moderada
25 mL Solución de LSS 12 % con PPG al 6.4%		1.6 g (6.4 %)	Solución transparenté amarillenta después de calentar

LSS: Lauril sulfato de sodio; PPG: Propilenglicol; BHI; Caldo infusión de cerebro-corazón

3.1.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ⁽²⁹⁾

El ensayo de CIM mediante el método de microdilución en placa para el aceite esencial de orégano de origen comercial después de la incubación se observó que las concentraciones en los pocillos de las columnas 8, 9 y 10 señalados en círculos rojos (Figura N° 10) desarrollo de crecimiento microbiano, no así en el resto de los pocillos de la microplaca lo cual indica que las concentraciones de 0.0012 %, 0.0006% y 0.0003% permiten el crecimiento del microorganismo de ensayo y por lo tanto los resultados evaluados visualmente indican que la CIM del aceite esencial de orégano sobre *S. mutans* es de 0.0025 %.

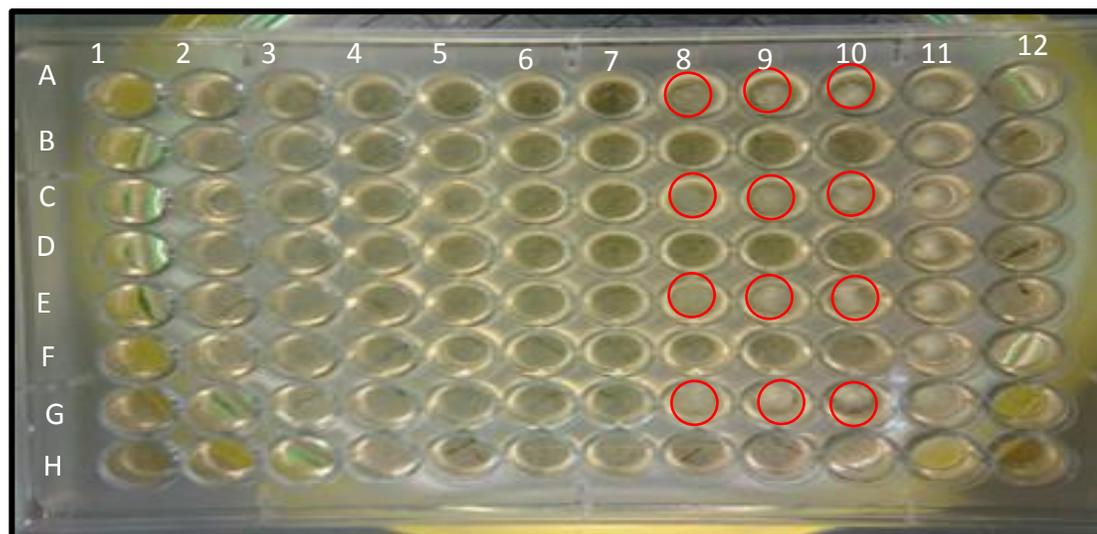


Figura N° 10: Microplaca de 96 después de incubar

Además de la evaluación visual de los resultados se hizo una evaluación mediante espectrofotometría.

Los resultados de absorbancia de la microplaca fueron tratados de la siguiente forma:

1. El Blanco A, las absorbancias de los pocillos con las soluciones de trabajo de AEO sin inocular, se corrigieron restando la absorbancia individual menos la absorbancia del blanco del caldo del pocillo 12 respectivo (control de esterilidad = Blanco B).

$$\text{Correccion por blancos} = \text{Blanco A} - \text{Blanco B}$$

Dónde:

Blanco A: Soluciones de trabajo de AEO sin inocular suspensión de *S. mutans*

Blanco B: control de esterilidad (BHI Estéril)

2. Se restó a la absorbancia individual de cada solución de trabajo de AEO el valor de la corrección de blanco calculado en el paso anterior, tanto para las lecturas de antes como para las de después de incubar.

Valor de Absorbancia corregido: $A_{AEO} - A_{\text{corregida de blancos}}$

Donde:

A_{AEO} : Absorbancia de los pocillos con AEO inoculadas con *S. mutans*

$A_{\text{corregida de blancos}}$: Valor de corrección por blancos

3. Las absorbancias del ensayo CIM mostradas en las gráficas se obtienen restando el valor de absorbancia corregido de la suspensión de prueba de AEO después de incubar menos el valor de absorbancia corregido de la suspensión de prueba de AEO antes de incubar.

Absorbancias de ensayo CIM: $A_d - A_a$

Donde:

A_d : Absorbancias corregidas del ensayo después de incubar microplaca

A_a : Absorbancias corregidas del ensayo antes de incubar microplaca

En la tabla N° 7 se reportan las absorbancias corregidas del ensayo, los datos señalados en color rojo indican que hubo crecimiento de la bacteria de prueba *S. mutans* a esas concentraciones y se puede observar que son aproximadamente 20 veces mayores que las absorbancias de los pocillos donde no hubo crecimiento.

Datos crudos (Raw Data) de las absorbancias del ensayo antes y después de incubar se reportan en el ANEXO N° 7

Tabla N° 7. Valores corregidos de absorbancias antes y después de incubar microplaca.

Absorbancia AEO y BLANCO antes de incubar Microplaca										
[%p/v]	0.08	0.064	0.040	0.020	0.010	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0.0003
A	0.013	-0.005	-0.048	0.006	0.063	0.048	-0.009	-0.028	-0.058	0.006
B	-0.012	-0.009	0.032	0.015	0.008	-0.007	0.014	0.01	0.029	-0.012
C	-0.058	-0.076	-0.068	0.067	-0.057	-0.011	-0.038	-0.139	-0.112	-0.042
D	0.042	0.069	0.05	0.038	0.057	0.04	0.022	0.135	0.075	0.034
E	-0.041	-0.027	-0.036	0.082	0.003	0.114	-0.063	0.001	-0.101	0.016
F	-0.006	0.005	0.022	-0.008	0.007	-0.042	0.071	0.006	0.055	-0.012
G	0.01	-0.097	-0.028	0.131	-0.016	-0.025	-0.091	-0.014	-0.034	0.049
H	-0.024	0.088	0.07	-0.035	0.035	0.084	0.079	0.045	0.025	-0.056
Absorbancia AEO y BLANCO después de incubar Microplaca										
[%p/v]	0.08	0.064	0.040	0.020	0.010	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0.0003
A	0.024	0.008	-0.023	0.005	-0.003	0.028	-0.02	0.244	0.296	0.325
B	-0.032	-0.031	0.001	-0.018	-0.016	-0.032	-0.014	-0.013	0.008	-0.013
C	-0.034	0.02	-0.031	0.018	-0.027	0.009	0.001	0.240	0.281	0.336
D	0.012	-0.028	0.013	-0.012	0.011	-0.004	-0.02	0.018	0.045	0.018
E	-0.017	0.005	0.008	0.022	-0.007	0.066	0.007	0.305	0.303	0.387
F	-0.026	-0.023	-0.022	-0.031	-0.019	-0.071	-0.005	-0.019	0.031	-0.029
G	0.041	0.04	-0.052	0.066	-0.013	-0.02	-0.067	0.250	0.377	0.47
H	-0.05	-0.044	0.022	-0.064	0.006	0.015	0.051	0.012	0.001	-0.066
Absorbancia AEO y BLANCO después de incubar Microplaca										
[%p/v]	0.08	0.064	0.040	0.020	0.010	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0.0003
A	0.011	0.013	0.025	-0.001	-0.066	-0.02	-0.011	0.272	0.354	0.319
C	0.024	0.096	0.037	-0.049	0.03	0.02	0.039	0.379	0.393	0.378
E	0.024	0.032	0.044	-0.06	-0.01	-0.048	0.07	0.304	0.404	0.371
G	0.031	0.137	-0.024	-0.065	0.003	0.005	0.024	0.264	0.411	0.421
Prom.	0.023	0.070	0.021	-0.044	-0.011	-0.011	0.031	0.305	0.391	0.372
D.E	0.008	0.057	0.031	0.029	0.040	0.030	0.034	0.052	0.025	0.042
C.V.	37.10	82.48	149.69	-66.91	-376.05	-277.35	110.33	17.20	6.51	11.23

Prom.: Promedio; D.E: Desviación Estándar; C.V: Coeficiente de Variación

Los resultados de recuento de las placas inoculadas del pocillo de control decrecimiento fueron de 2.5×10^5 UFC/mL lo cual indica que se inoculó la concentración correcta de suspensión de prueba es decir aproximadamente 10^5 UFC/mL de *S. mutans* como manda el método oficial.

A continuación en la Figura N° 11 se ilustra el grafico de las absorbancias corregidas versus concentración de AEO en el ensayo CIM.

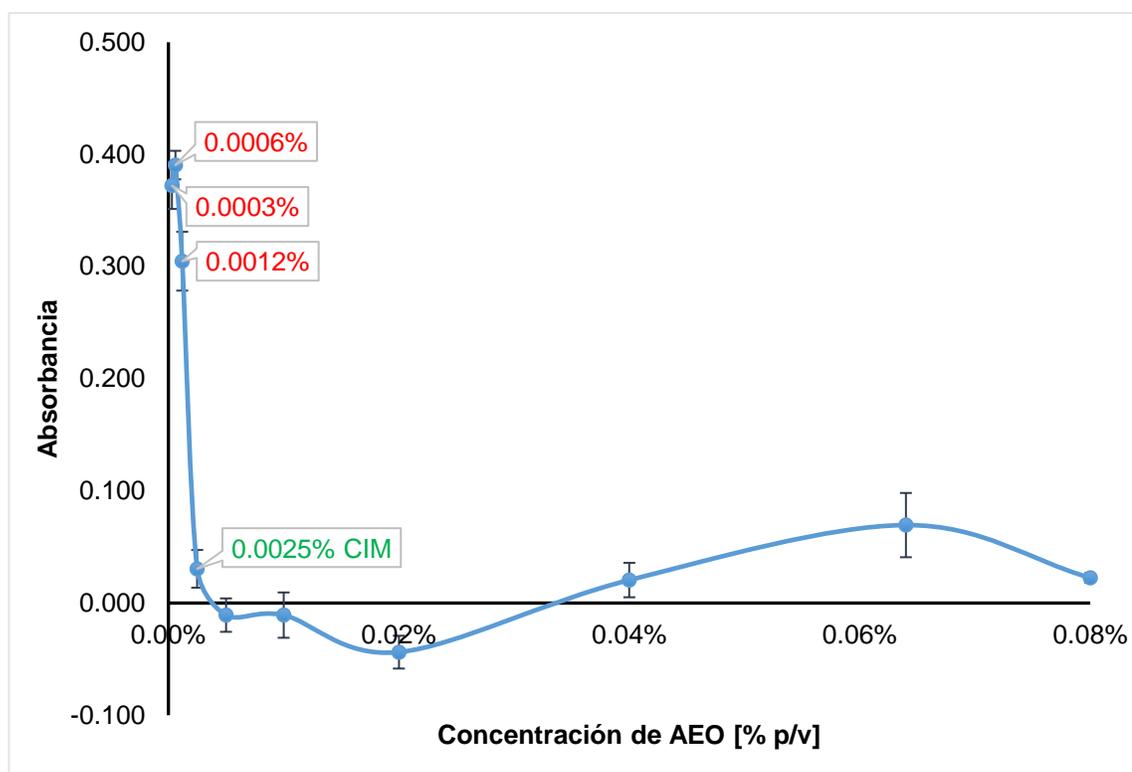


Figura N° 11. Absorbancias promedio versus concentraciones de AEO

Los resultados de las lecturas espectrofotométricas confirman lo observado mediante la lectura visual, e indican que únicamente hay valores de absorbancia mayores en las concentraciones de 0.0003, 0.0006 y 0.0012 % de AEO indicando que a esas concentraciones un inóculo de 10^5 UFC/mL de *S. mutans* no fue inhibido y que a partir de la concentración de 0.0025% de AEO si hubo inhibición.

También en la Figura N° 11 se puede observar que a partir de la concentración de 0.0025 % de AEO hay un descenso de las absorbancias manteniéndose la mayoría de ellas cercanas a cero. Por lo tanto la concentración inhibitoria del AEO de origen comercial evaluado frente a *S. mutans* es de 0.0025%, dicha concentración es más baja que la CIM reportada en la bibliografía consultada la cual se reportaba de 0.0629 % ⁽⁵⁾ lo cual se puede deberse a diferentes factores: alteraciones en la concentración de los metabolitos activos con actividad antibacteriana presentes en el aceite esencia de orégano, puntualmente al timol y carvacrol, variaciones en el lugar de cultivo de la planta de la cual se extrajo el aceite esencial, parte de la planta utilizada ,método de extracción empleado, solvente de extracción y las condiciones de almacenamiento del mismo posterior a su obtención ⁽⁸⁾.

La utilización de la espectrofotometría mostro ser un apoyo útil en la realización de este ensayo y si bien se observa aumento de la absorbancia en las concentraciones de 0.040%, 0.064% y 0.080%de AEO esto puede deberse a diversos factores como: aumento de la concentración de AEO, debido a que el color del aceite esencial de orégano es amarillo esto puede dar interferencia a la hora de la lectura a medida que aumenta la concentración del mismo, variaciones en la inoculación con los instrumentos de pipeteo utilizados, interferencias durante la lectura de la microplaca con el equipo espectrofotométrico, la presencia de espuma en los pocillos u otras fluctuaciones propias del equipo.

5.2 DETERMINACION DE LA ADECUABILIDAD DEL MÉTODO DE RECuento UTILIZADO PARA EVALUAR CONTENIDO MICROBIANO

Consistió en seleccionar los neutralizantes adecuados para las soluciones de prueba evaluadas. Según la bibliografía consultada, el Polisorbato 80 se considera un agente neutralizante de compuestos fenólicos como el timol y carvacrol, los cuales están presentes en el aceite esencial de orégano y por tal motivo se decidió realizar la prueba utilizando Polisorbato 80 al 1% ⁽⁶⁾.

Los grupos de prueba evaluados fueron los siguientes:

- Grupo de Prueba 1A: Colutorio de AEO 0.10%
- Grupo de Prueba 1B: Vehículo del colutorio
- Grupo de Prueba 1C: Colutorio de CHX 0.12 %
- Grupo 2: Grupo Control Peptona
- Grupo 3: Grupo Viabilidad

Para realizar la prueba se inocularon los grupos de prueba de tal forma de que cada uno de ellos permitiera la recuperación de aproximadamente 10^2 UFC/mL. En la tabla N° 8 se reportan los recuentos de los diferentes grupos de prueba a las 72 horas.

Tabla N° 8. Número de colonias en cada placa de grupos de Prueba

N° PLACA	Recuentos de los cultivos de las soluciones de prueba (UFC/placa)				
	GRUPO 1A	GRUPO 1B	GRUPO 1C	GRUPO 2	GRUPO 3
1	107	158	0	104	103
2	99	125	0	78	98
PROMEDIO	103	142	0	91	101

Para que la prueba sea válida debe de cumplir:

- Recuperación: Cociente entre el recuento de colonias del grupo de prueba y grupo control peptona mayor a 0.5

- Ausencia de toxicidad: Cociente entre el recuento de colonias del grupo control peptona y grupo de viabilidad mayor a 0.7

Cálculos:

Recuperación:

$$\text{Grupo 1A: } \frac{103}{91} = 1.13 \quad \text{Grupo 1B: } \frac{142}{91} = 1.55 \quad \text{Toxicidad: } \frac{91}{101} = 0.90$$

Los cocientes del grupo control de prueba y control peptona fueron de 1.13 para el vehículo y de 1.55 para el colutorio lo cual demuestra que el neutralizante seleccionado es capaz de inactivar la acción antibacteriana de los Grupos de Prueba 1A y 1B y el cociente de toxicidad fue de 0.90 lo que indica que este no es toxico para la bacteria de prueba y por lo tanto permite recuperar la bacteria de prueba en presencia de los agentes neutralizantes.

En el caso del Grupo de prueba 1C no fue posible recuperar a la bacteria de prueba con Polisorbato 80 como neutralizante y esto posiblemente se debe a que la estructura de la CHX contiene dos anillos de benceno y además es un compuesto clorado. Dado que el Polisorbato 80 inactiva principalmente compuestos fenólicos, su acción no es suficiente para neutralizar compuestos halogenados como la clorhexidina.

Se realizó nuevamente la adecuabilidad del método para el colutorio de CHX utilizando la siguiente mezcla de neutralizantes que inactivan la actividad antibacteriana de los compuestos halogenados como la CHX ⁽⁶⁾.

Tiosulfato de sodio: 0.05%

Lecitina: 0.5%

Polisorbato 80: 1.0%

En la Tabla N° 9 se reportan los recuentos de colonias a las 72 horas en los diferentes grupos de prueba.

- Grupo 1: Grupo de Prueba colutorio de CHX 0.12 %
- Grupo 2: Grupo Control Peptona
- Grupo 3: Grupo Viabilidad

Tabla N° 9. Numero de colonias en cada placa de Grupos de Prueba

N° PLACA	Recuentos de los cultivos de las soluciones de prueba (UFC/placa)		
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
1	0	115	108
2	0	119	101
PROMEDIO	0	117	104

De acuerdo a lo resultados observados no fue posible recuperar la bacteria de prueba en el grupo de prueba CHX por lo tanto se aumentó la concentración de tiosulfato de sodio a 0.3% y se realizó una vez más el ensayo bajo las mismas condiciones del ensayo anterior.

En la Tabla N° 10 se reportan los recuentos de colonias a las 72 horas del segundo ensayo de adecuabilidad de CHX con tiosulfato de sodio 0.3%, lecitina 0.5% y Polisorbato 80 al 1%.

Tabla N° 10. Numero de colonias en cada placa de Grupos de Prueba

N° PLACA	Recuentos de los cultivos de las soluciones de prueba (UFC/placa)		
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
1	57	55	45
2	59	46	56
PROMEDIO	58	50	50

Cálculos:

$$\text{Grupo 1: } \frac{58}{50} = 1.16 \quad \text{Toxicidad: } \frac{50}{50} = 1.0$$

El cociente del grupo control de prueba y control peptona fue de 1.16 para el colutorio de CHX lo cual demuestra que el neutralizante seleccionado es capaz de neutralizar la actividad antimicrobiana del colutorio de CHX y el cociente de toxicidad fue de 1.0 lo que indica que no es tóxico para la bacteria de prueba por lo tanto con ésta mezcla de neutralizantes es posible recuperar la bacteria de prueba.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS COLUTORIOS DE AEO Y CHX SOBRE *S. mutans*

Con los medios y neutralizantes definidos en la fase anterior se realizó la determinación de la eficacia antibacteriana in vitro del colutorio de aceite esencial de orégano sobre *S. mutans*.

En la Tabla N° 11 y N° 12 se reportan los resultados de los recuentos microbianos de las placas en los diferentes tiempos de muestreo. En todos los casos se cumple el inicio de la prueba con recuento de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL en producto.

Tabla N°11. Recuentos microbianos en tiempo cero en las formulaciones estudiadas

Dilución Placa	Vehículo y colutorio 0.10% (UFC/placa)		Colutorio 0.05% AEO (UFC/placa)		Colutorio de CHX 0.12% (UFC/placa)	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
1	192	16	156	13	103	6
2	207	27	158	24	99	6
Promedio	199	21.5	157	18.5	101	6
UFC/mL en suspensión de inóculo	1.99x10 ⁸		1.57x10 ⁸		1.01x10 ⁸	
UFC/mL en producto	1.98x10 ⁶		1.57X10 ⁶		1.00X10 ⁶	

Tabla N° 12. Recuentos microbianos en los diferentes tiempos de prueba para cada una de las formulaciones estudiadas.

MUESTRA	Tiempo en Fracciones de minuto	Dilución 10 ⁻⁴	Promedio (UFC/mL)	Dilución 10 ⁻⁵	Promedio (UFC/mL)	Promedio (UFC/mL)	
VEHICULO	0.5	161	1.76×10 ⁶	25	1.95×10 ⁶	1,85 x10 ⁶	
		192		14			
	1	215	2.14×10 ⁶	21	2.15×10 ⁶	2,14 x10 ⁶	
		214		22			
	5	211	2.31×10 ⁶	25	3.30×10 ⁶	2,80 x10 ⁶	
		251		41			
	10	191	2.08×10 ⁶	29	2.40×10 ⁶	2,24 x10 ⁶	
		225		19			
	15	154	1.60×10 ⁶	10	1.20×10 ⁶	1,40 x10 ⁶	
		167		14			
	30	224	2.27×10 ⁶	15	1.30×10 ⁶	1,70 x10 ⁶	
		231		11			
	COLUTORIO DE AEO 0.05%	0.5	158	1.30×10 ⁶	12	1.40 x10 ⁶	1.35×10 ⁶
			103		16		
1		132	1.31×10 ⁶	11	7.50 x10 ⁵	1.03×10 ⁶	
		131		4			
5		84	9.10×10 ⁵	8	8.00 x10 ⁵	8.55×10 ⁵	
		98		8			
10		83	9.90×10 ⁵	11	1.30 x10 ⁶	1.14×10 ⁶	
		115		15			
15		123	1.07×10 ⁶	9	1.00 x10 ⁶	1.03×10 ⁶	
		91		11			
30		90	9.25×10 ⁵	9	7.00 x10 ⁵	8.12×10 ⁵	
		95		5			
COLUTORIO DE AEO 0.10%	0.5	170	1.71×10 ⁶	21	2.50×10 ⁶	2.10 x10 ⁶	
		172		29			
	1	28	3.00×10 ⁵	6	5.50×10 ⁵	4,25 x10 ⁵	
		32		5			
	5	144	1.44×10 ⁶	13	1.30×10 ⁶	1,37 x10 ⁶	
		----		13			
	10	125	1.10×10 ⁶	11	1.10×10 ⁶	1.10 x10 ⁶	
		96		11			
	15	79	7.60×10 ⁵	12	1.30×10 ⁶	1,03 x10 ⁶	
		73		14			
	30	93	9.70×10 ⁵	11	1.35×10 ⁶	1,16 x10 ⁶	
		101		16			

Tabla N° 12. Continuación.

Muestra	Tiempo min.	Dilución 10 ⁻¹	Promedio UFC/mL	Dilución 10 ⁻²	Promedio UFC/mL	Promedio (UFC/mL)
COLUTORIO DE CHX 0.12%	0.5	2	1.50x10 ¹	2	2.00x10 ²	1.07x10 ²
		1		0		
	1	1	1.50x10 ¹	1	1.00x10 ²	5.75x10 ¹
		2		1		
	5	0	0	1	1.00x10 ²	1.00x10 ²
		0		0		
	10	6	4.00x10 ¹	0	0	4.00x10 ¹
		2		0		
	15	5	6.50x10 ¹	-----	-----	6.50x10 ¹
		8		-----		
	30	8	6.50x10 ¹	-----	-----	6.50x10 ¹
		5		-----		

(-----): significa que no hay datos porque no se realizaron muestreos en esos tiempos.

En la tabla N° 13 se reportan los porcentajes de reducción de cada grupo de prueba sobre *S. mutans*.

Tabla N° 13. Porcentaje de reducción de los diferentes grupos de prueba

Grupo de prueba	Tiempo (min) y porcentaje de Reducción Alcanzado						Reducción máxima alcanzada
	0.5	1	5	10	15	30	
Vehículo	6.566	-8.080	-41.414	-13.131	29.292	14.141	15 min. 29.292 %
Colutorio 0.05% AEO	14.012	34.394	45.541	27.388	34.394	48.280	30 min. 48.280%
Colutorio 0.10 % AEO	-6.060	78.535	30.808	44.444	47.979	41.414	1 min. 78.535%
Colutorio CHX 0.12%	99.989	99.994	99.990	99.996	99.993	99.993	10 min. 99.996%

Ejemplo de cálculo para determinar porcentaje de reducción del vehículo en el tiempo de 0.5 min:

$$\frac{\text{Concentración en vehículo en } t_{0.5 \text{ min}}}{\text{Concentración en vehículo en } t_0} = \frac{1.85 \times 10^6 \text{ UFC/mL}}{1.98 \times 10^6 \text{ UFC/mL}} = 0.93434 \times 100 \% = 93.434 \%$$

100 % - 93.434 % = 6.566 % de reducción en el tiempo de 0.5 minutos.

Los valores negativos de % de reducción de la tabla N° 13 indican que hubo crecimiento de la bacteria de prueba.

Los resultados obtenidos reflejan que tanto el colutorio al 0.05% y 0.10% de AEO tienen actividad antibacteriana frente a *S. mutans* alcanzando un máximo porcentaje de reducción de 48.280% a los 30 min y de 78.535% a 1 min respectivamente, las cuales son mayores que la presentada por el vehículo sólo que fue de 29.292% a los 15 minutos. De acuerdo con esto la actividad que presentan ambos colutorios es del tipo bacteriostático porque hay un cierto porcentaje de reducción que se refleja a medida pasa el tiempo pero no hay eliminación cercana a 99.999% del microorganismo. ⁽⁶⁾

El porcentaje de reducción que presentó el colutorio de CHX al 0.12% fue de 99.996 % a 10 min de exposición frente a *S. mutans* lo cual indica que el efecto es bactericida.

La figura N°12 ilustra la sobrevivencia del *S. mutans* en el vehículo del colutorio de aceite esencial de AEO.

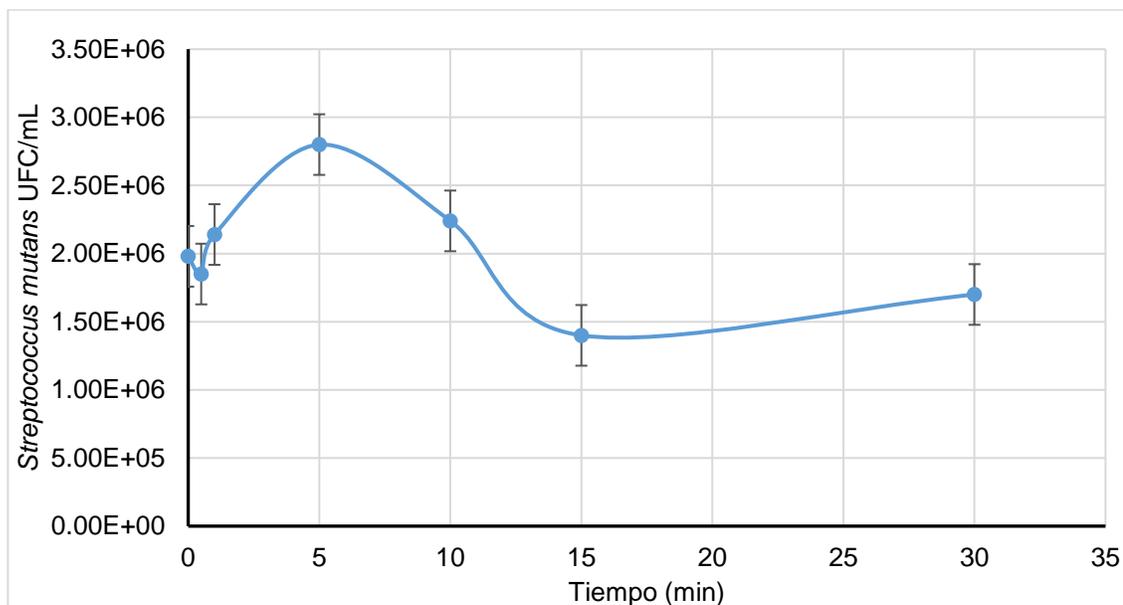


Figura N° 12. Concentración UFC/mL versus tiempo de exposición en el vehículo

El tiempo que registro mayor reducción microbiana en el vehículo fue el de 15 minutos en el cual se observa una reducción del 29.292 % tal como se muestra en la tabla N° 14. Es posible que la actividad de los preservantes presentes en el vehículo solamente sea detectable después de los 10 min ya que aunque todavía no se comprende bien el mecanismo de acción de los parabenos frente a los microorganismos se tienen 2 hipótesis: que interrumpen los procesos de transporte de membrana o inhiben la síntesis de ADN y ARN o de algunas enzimas clave, como ATPasas y Fosfotransferasas.

Cualquiera que sea el modo de acción desarrollado es posible que no tenga un impacto inmediato sobre la sobrevivencia del microorganismo y por ello es posible que la reducción microbiana no sea detectable inmediatamente (28). Sin embargo, de acuerdo a la especificación de la prueba de eficacia antimicrobiana se esperaría que debido a ser un producto de administración oral con base acuosa reduzca aproximadamente un 99% después de 14 días (27).

Estos resultados indican que la actividad antimicrobiana del vehículo no es suficiente para alcanzar el valor requerido que es de 99.999% de reducción para todos los productos con actividad antibacteriana.

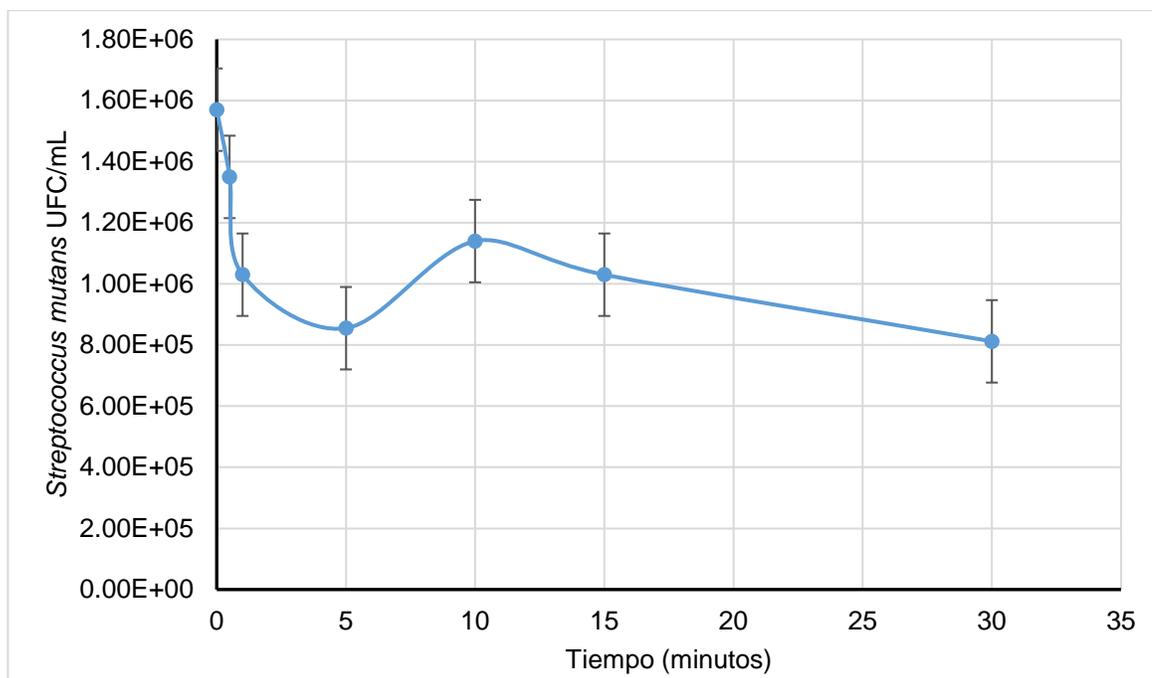


Figura N° 13. Concentración de *S. mutans* (UFC/mL) versus tiempo de exposición en el colutorio de AEO 0.05%

La reducción producida por el colutorio de AEO 0.05% es más baja que la requerida para considerar al producto como bactericida (Figura N°13). En general este estudio indicó una reducción lenta pero aproximadamente constante del microorganismo desde los 30 segundos, y a pesar de que se observa un ligero aumento del recuento en el producto a los 10 minutos no se considera que este sea significativo, y se puede deber al error intrínseco del método de análisis. Finalmente se observa una reducción máxima de aproximadamente 50% de los microorganismos inoculados a los 30 minutos de estudio en el colutorio de AEO al 0.05 %.

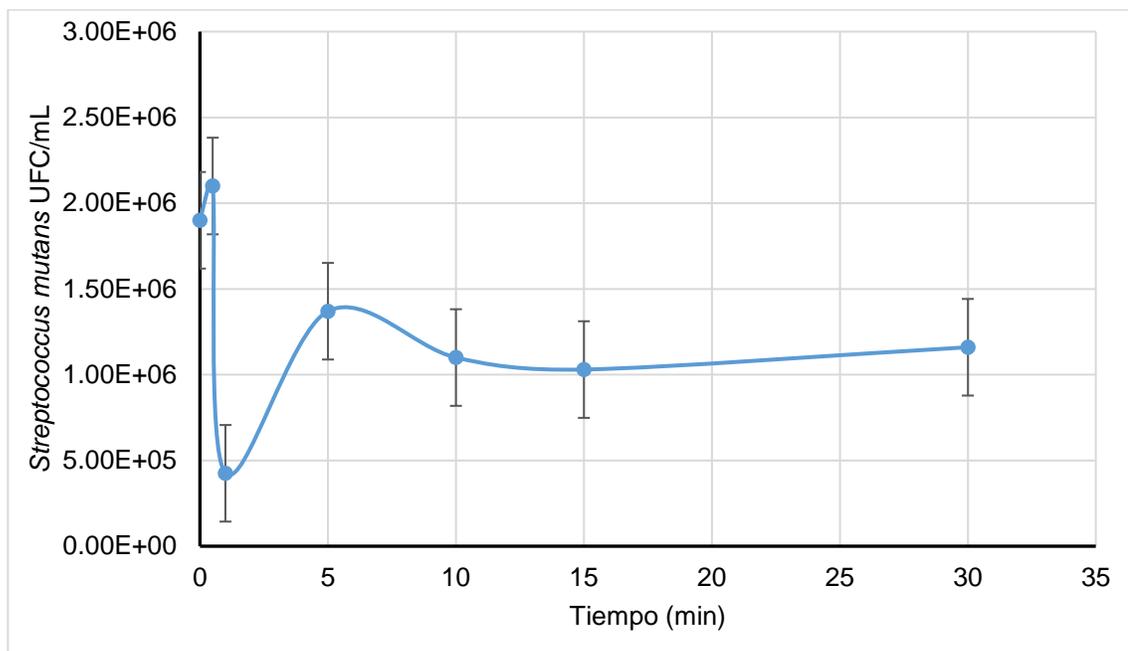


Figura N° 14. Concentración de *S. mutans* UFC/mL versus tiempo de exposición en el colutorio de AEO 0.10%

En la Figura N°14 se ilustra la tendencia de la gráfica de concentración microbiana versus tiempo de exposición del *S. mutans* en el colutorio al 0.10% de AEO.

Los resultados mostraron que el colutorio de AEO al 0.10% presenta una reducción del conteo del microorganismo en cada tiempo de muestreo seleccionado con referencia al conteo inicial, la máxima reducción se ve reflejada en el tiempo de 1 minuto (figura N° 14) el cual presenta un porcentaje de reducción de 78.535 % equivalente a una concentración de 4.25×10^5 UFC/mL con respecto a la concentración inicial de *S. mutans*, esta reducción es menor que la requerida por la AOAC para sustancias bactericidas. Entre los factores que podrían haber afectado la actividad antimicrobiana del timol de estos productos se pueden mencionar el tipo de microorganismo, pH del medio y la temperatura

de incubación (8). Es posible que modificando factores en la formulación como el pH se obtenga actividad antibacterianas mayores.

Para el colutorio de CHX 0.12% se observó reducción microbiana desde los 30 segundos, observándose una reducción constante durante todo el tiempo de estudio (Figura N° 15). Sin embargo no fue una eliminación completa de los microorganismos porque incluso a los 30 minutos todavía se seguían recuperando algunos microorganismos según el recuento realizado.

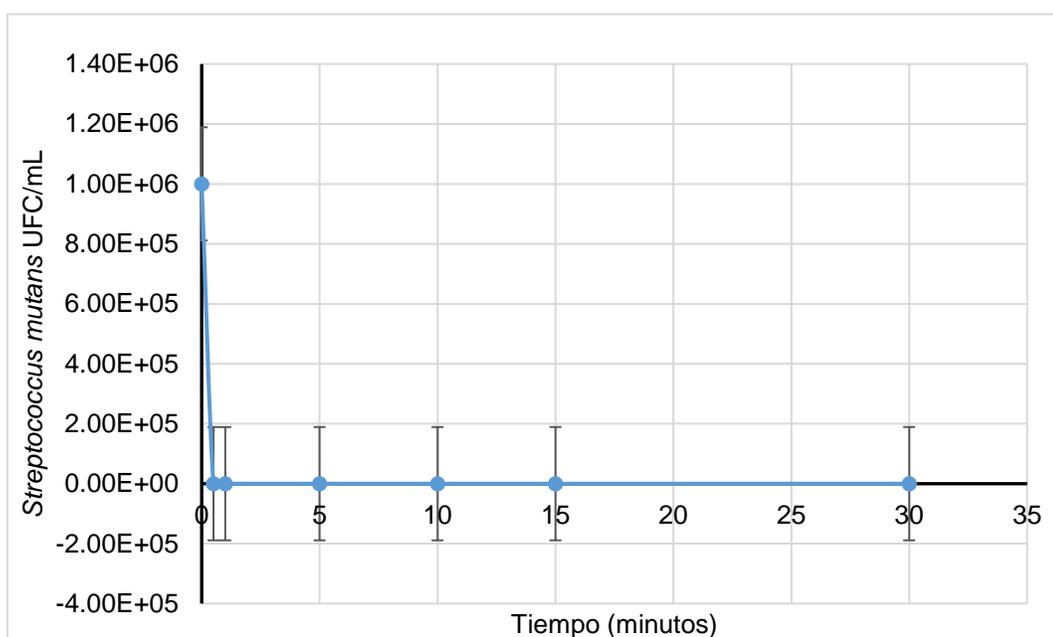


Figura N° 15. Concentración de *S. mutans* UFC/mL versus tiempo de exposición en el colutorio de CHX 0.12%

Los resultados muestran que la máxima reducción producida por este colutorio fue de 1.0×10^6 UFC/mL a 40 UFC/mL de *S. mutans* es decir aproximadamente una reducción del 99.996% en 10 minutos de exposición con respecto al valor inicial del inóculo, lo cual todavía no cumple el valor requerido por la AOAC (99.999%), pero si cumple el valor rotulado por el fabricante (99.99% de reducción).

5.4 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA DE LOS COLUTORIOS DE ACEITE ESENCIAL DE *O. vulgare* L. AL 0.1% Y 0.05% Y DICHS RESULTADOS CON LOS OBTENIDOS EN EL COLUTORIO DE CLORHEXIDINA 0.12%.

Al hacer un gráfico comparativo de la sobrevivencia de *S. mutans* en las cuatro soluciones estudiadas (Figura N°. 16), se observa que todas ejercieron un efecto reductor sobre los recuentos del microorganismo de reto en comparación con el vehículo.

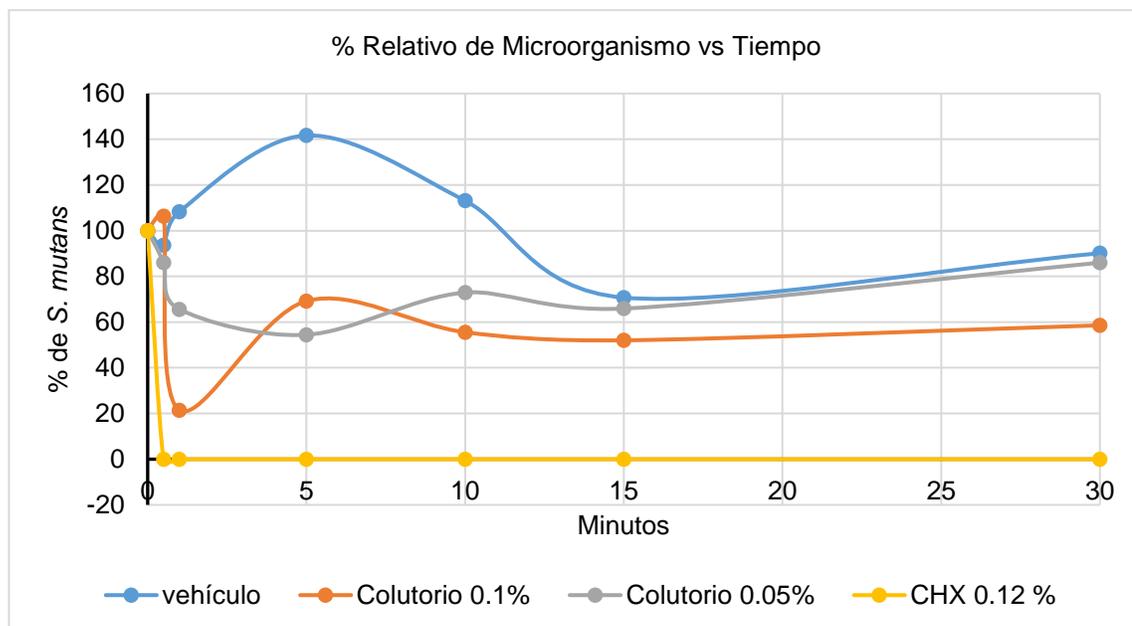


Figura N° 16. Comportamiento de los cuatro grupos de prueba estudiados frente a *S. mutans*

En la figura N° 16 se observa que el colutorio al 0.1% de AEO mostró una reducción mayor frente a *S. mutans* que el colutorio al 0.05% de AEO siendo está superada por el colutorio de clorhexidina 0.12%. Sin embargo, ninguno de los productos estudiados fueron 100 % efectivo contra el crecimiento bacteriano. En el estudio la CHX mostró una mayor reducción del microorganismo de prueba,

debido a su conocido efecto contra microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos como es el caso del *S. mutans* la cual fue de 99.996% (7). En cambio el colutorio de AEO al 0.05% y 0.10% mostraron una reducción máxima de 48.38% y 78.53% respectivamente. Por lo tanto se puede notar que la reducción de estos tres no alcanza el valor especificado por la AOAC de 99.999 % y solamente la reducción del colutorio de CHX alcanzó una reducción de 99.99% de la flora microbiana como lo indica la etiqueta de dicho producto.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de orégano de origen comercial analizado muestra una Concentración Inhibitoria Mínima de 0.0025% frente al *S. mutans*.
2. El polisorbato 80 a una concentración del 1% no mostró toxicidad frente al *S. mutans* lo cual lo convierte en el neutralizante idóneo para determinar la carga microbiana de las formulaciones de los colutorios de aceite esencial de orégano estudiados.
3. Una mezcla constituida por tiosulfato de sodio 0.3%, polisorbato al 0.1% y lecitina al 0.5% es el neutralizante idóneo que incorporado al medio de cultivo permite la recuperación del *S. mutans* del colutorio de clorhexidina.
4. El porcentaje de reducción presentado en el caso de las dos formulaciones de aceite esencial de orégano fue menor en comparación a los resultados obtenidos por el colutorio de clorhexidina.
5. Ninguno de los tres colutorios alcanzó el 99.999% de reducción especificado por la AOAC, siendo el colutorio de clorhexidina el que alcanzó el porcentaje de reducción más próximo a la especificación, el cual fue de 99.996%.
6. Los colutorios de aceite esencial de orégano presentan reducción en comparación con el vehículo de la formulación de lo que se infiere una actividad de tipo bacteriostática con buenas perspectivas para el desarrollo de futuras formulaciones a partir de este aceite esencial.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar bioensayos que permitan ampliar el espectro de comprensión sobre las ventajas que tiene el empleo de productos formulados con aceite esencial de orégano como parte de una alternativa natural y segura en el cuidado de la salud bucodental.
2. estudiar el aceite esencial de orégano obtenido a partir de otras especies de orégano por ejemplo *Lippia graveolens* dentro de nuevas formulaciones de este tipo.
3. Ensayar la incorporación del aceite esencial de orégano en nuevas formulaciones que potencialicen las diferentes propiedades manifestadas por el mismo como lo son actividad antibacteriana y antiinflamatoria de gran importancia a nivel de la industria cosmética-farmacéutica.
4. Elaborar productos tanto cosméticos como farmacéuticos con activos de origen natural que mejoren los efectos indeseados como la decoloración de los dientes mostrados por aquellos de naturaleza química.
5. Caracterizar fitoquímicamente el aceite esencial de orégano comercial utilizado para futuras formulaciones y tener una mayor fuente de datos para poder indicar el tipo y la cantidad de componente coadyuvantes de la actividad antibacteriana y farmacológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (2000). 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. U.S.A.
2. Arcila Lozano, Loarca Piña, Lecona Uribe y De Mejía (2003). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Consultado en línea el 09 de febrero de 2015, disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=es
3. Bastos Oyarzabal, et al (2011) Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas de la leche de bovino. consultado el 20 de abril de 2015 Disponible:
http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol16_3_11/pla06311.html
4. Cardona Henao y Mejía G. Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* L. y *Thymus vulgaris*. Biosalud, Volumen 8, enero - diciembre, 2009. págs. 58 - 70. Consultado en línea el 23 de abril del 2015, Disponible en:
http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2F200.21.104.25%2Fbiosalud%2Fdownloads%2FRevista%25208_7.pdf&ei=2URLVY7LCYq8ggScsoBI&usg=AFQjCNGKVUuDFPzeGjC3Of_dRT0oIELQ7w&sig2=9qLwhwVAZ5WHxcu_ALBObw&bvm=bv.92765956,d.eXY

5. Cassiano Busatta, Mossi y Alves Rodrigues, Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. Brazilian Journal of Microbiology, Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38:610-616.
6. Clontz. Microbial limit and bioburden tests: validation approaches and global requirements. Second Edition. CRC Press. 2008
7. Figueroa Gordon, Alonso y Acevedo. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. volumen 47 nº 1, 2009.consultado en línea el 12 de marzo de 2015. disponible en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2009/1/microorganismos_progresion_lesion_caries_dental.asp
8. García García y Palou García. (2008). Mecanismo de acción antimicrobiana del timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Universidad de las Américas. Puebla. México.
9. Guadrón Novoa. (2007). Efecto sobre la placa bacteriana de los antisépticos bucales. Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. San Salvador, El Salvador. Octubre 2007.
10. Leite de Souza, Carneiro de Barros, Conceição, Gomes Neto y Vieira da Costa. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. Brazilian Journal of Microbiology. vol.40 no.2 São Paulo Apr./June 2009
11. MacFaddin. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3° edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

12. Maravi Inga (2012). Efecto antibacteriano y antifungico del aceite esencial de: *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* 90028. Universidad Privada Norbert Wiener. Facultad de Ciencias de la salud .Escuela Académica Profesional de Odontología. Lima, Perú.
13. Martínez M. (2003). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia. Facultad Química Farmacéutica. Medellín, Febrero
14. Medina A, Moreno C, Velasco R y Gutiérrez C. (2005). Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro". Universidad Nacional de Colombia. NOVA - Publicación Científica ISSN: 1794-2470 vol.3 no 3: 1-120
15. Ministerio de Salud de El Salvador. Diagnóstico nacional de salud bucal San Salvador, junio de 2012. Consultado en línea el 15 de febrero. Disponible en: http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/otrosdoc/diagnostico_nacional_salud_bucal.pdf.
16. Montes de Oca Ch. Placa bacteriana, Servicio de Odontología, Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia. San José, Costa Rica.
17. Muñoz Centeno. Plantas Medicinales Españolas: *Origanum vulgare* L. Acta Botánica Malacitana 2002. Disponible en línea en: http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.biolveg.uma.es%2Fabm%2Fvolumenes%2Fvol27%2F27_munozcenteno.pdf&ei=F0JLVeupDYucgwSH1IC

4AQ&usg=AFQjCNHmTDqZmgcrEhbkyZizzspzEGMAQ&sig2=oTyA0wxFv
R-VoQd_e3V7LA&bvm=bv.92765956,d.eXY

18. Naverac Aznar M, De Grado Cabanilles P. y Gil Loscos F. (2007). Periodoncia Para el higienista dental: Uso de colutorios en la clínica periodontal. Periodoncia y Osteointegración. Vol.17 1, 2,5.
19. Negroni (2009). Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Bueno Aires. Médica Panamericana. Disponible en :
<https://books.google.com.gt/books?id=GxmuivjZBgC&pg=PA301&dq=clorhexidina&hl=es419&sa=X&ei=Kk1hVayEF6jHsQTmslCoDw&ved=0CBMQ6AEwAA#v=onepage&q=clorhexidina&f=true>
20. Ojeda Garcés, Oviedo García, Salas (2013) Streptococcus mutans y caries dental. (Streptococcus mutans and dental caries). Revista CES odontología. Vol.26(1)
21. Rivera Gómez (2013). Caries Dental. Texto de Operatoria Dental Clínica. Disponible en: <http://es.slideshare.net/circegomezrivera/caries-dental-18698663>
22. R. Taroco, V. Seija y R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Consultado en Línea el 09 de febrero de 2015, disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
23. Serrano Granger y Herrera (2005). La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? Vol 10, N°4, 431-439. Disponible en :

<http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fscielo.isciii.es%2Fpdf%2Frcoe%2Fv10n4%2Fpuesta3.pdf&ei=CkdLVZTIPlqnNpSKgPAB&usg=AFQjCNF8RsxFu051fe9j57vIRs3JGwuow&sig2=aWKAZA73gzmlHenNrH0yw&bvm=bv.92765956,d.eXY>

24. Sieber Carrasco (2012). Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. Tesis doctoral, Universidad de Chile en Santiago, Chile.
25. Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (2009). Manual de Higiene Bucal. Madrid: Médica Panamericana. Disponible en :https://books.google.com.gt/books?id=__8Xco483NgC&pg=PA120&dq=aceites+esenciales+y+su+utilidad+en+colutorios&hl=es419&sa=X&ei=g5iVdWKNLDisAT8u4CYCw&ved=0CBMQ6AEwAA#v=onepage&q=aceites%20esenciales%20y%20su%20utilidad%20en%20colutorios&f=true
26. Souza Prestes, Frascolla, Santin, Ziemann dos Santos, Costa Schram, y Alves Rodrigues (2008). Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Brasil.
27. United States Pharmacopeia Convention (2007). USP 30. NF 25. The United States Pharmacopeial. The National Formulary. Rockville. USA.
28. Valkova. N. (June 2001) Hydrolysis of 4 Hydroxylbenzoic Acid Ester (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant Enterobacter cloacae Strain EM. American Society For Microbiology.

29. Wiegand, Hilpert, y W Hancock (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. NATURE PROTOCOLS, vol. 3 N° 2, 163- 175.
30. Wilkinson, J.B. y Moore R.J. (1990) Cosmetología de Harry. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, S.A. Disponible en: <https://books.google.com.gt/books?id=fnQ9mGMH15oC&pg=PA696&dq=enjuagues+bucal&hl=es419&sa=X&ei=QLNhVZDcDaLisATv0oFI&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=enjuagues%20bucal&f=true>
31. A. Zerón (2003). Cómo conservar sus dientes y encías toda la vida. México: México. Disponible en: <https://books.google.com.gt/books?id=putFvfVJuXEC&pg=PA47&dq=enjuagues+bucal&hl=es419&sa=X&ei=faphVeTiFsKMNsCag8AP&ved=0CC8Q6AEwBA#v=onepage&q=enjuagues%20bucal&f=true>
32. <http://fichas.infojardin.com/condimentos/origanum-vulgare-O.vulgare-L.-mejorana-silvestre-orenga.htm>, Orégano, Mejorana silvestre, Orenga, consultado en línea el 09 de febrero del 2015
33. [http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/origanum-vulgare-O.vulgare L., *Origanum vulgare* L. \(O. vulgare L.\)](http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/origanum-vulgare-O.vulgare-L.,OriganumvulgareL.(O.vulgareL.)). Consultado en línea el 09 de febrero del 2015
34. http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html. Microbiología General y Bucal .Práctica 6: Antibiograma. Consultado el 23 de abril del 2015.

ANEXOS

ANEXO N° 1
FOTOGRAFIAS DEL TRABAJO EN EL LABORATORIO



Figura No 17. Colutorios de AEO



Figura No 18. Colutorio de CHX

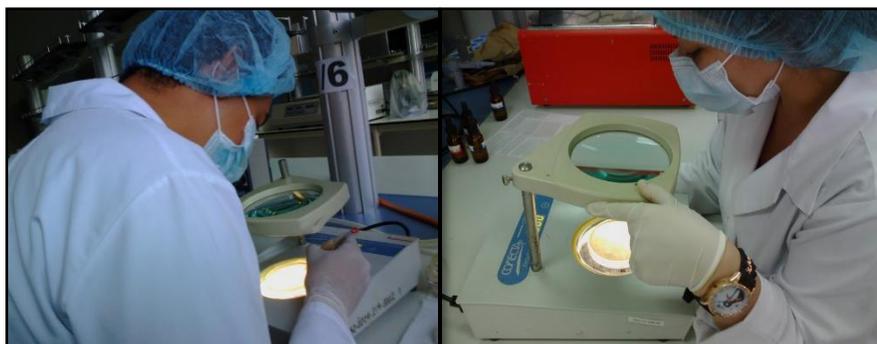


Figura No 19. Recuento de colonias

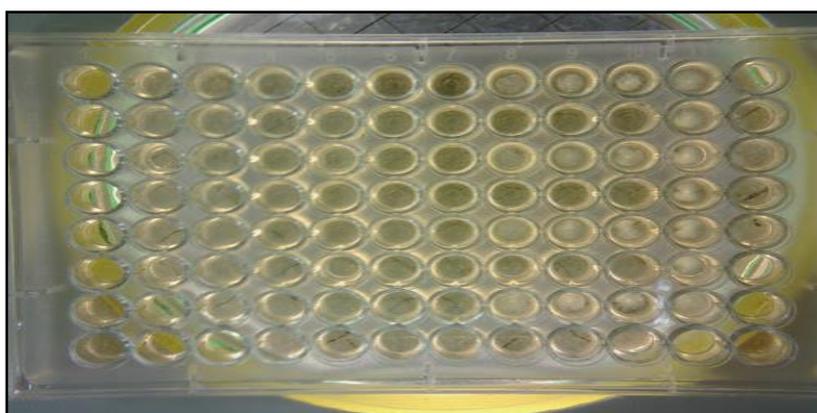


Figura No 20. Microplaca de 96 pocillos

ANEXO N° 2
MATERIALES Y EQUIPOS

MATERIALES

- Agitadores de vidrio
- Asa bacteriológica de platino
- Asa en L
- Beaker de 50 ml, 100 mL, 150 mL, 600 mL, 1000 mL
- Desecador
- Erlenmeyer de 50 mL, 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL
- Espátulas
- Gradillas para tubos de ensayo
- Gradillas para tubos para viales
- Microplacas en V de 96 pocillos
- Palillos plásticos
- Pipetas morh de 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Placas petri de 90x15 mm
- Probeta de 100 mL
- Puntas de 200 μ L, 1.0 mL
- Tubos cónicos
- Tubos de ensayo de 10 mL, 15 mL, 20 mL
- Tubos de eppendorf de 1.5 mL
- Tubos para viales

EQUIPOS

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza semianalítica
- Baño María
- Cámara de Flujo Laminar
- Cámara de luz ultravioleta
- Cámara fotográfica

- Celdas para espectro
- Computadora
- Congelador
- Contador de colonias
- Detector de Elisa
- Espectrofotómetro
- Estufa
- Hot Plate
- Impresora
- Incinerador
- Incubadora
- Mechero bunsen
- Micropipeteadores automático de 100 μ L, 200 μ L, 1 mL
- Microscopio
- pHmetro
- Pipeteador automático multicanal
- Pipeteador de 10 mL, 1 mL
- Portaobjetos
- Refrigeradora
- Termómetro
- Vortex

ANEXO N° 3
PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO

Caldo Müller Hinton ⁽¹¹⁾

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión de carne	300.0 g
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Procedimiento:

Suspender 22 g del medio en un litro de agua destilada y dejar embeber 10 minutos, agitando periódicamente. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en tubos, esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar MuellerHinton+ 5% de Sangre Desfibrinada de Carnero ⁽¹¹⁾

Fórmula por litro de agua purificada

Extracto de carne bovina	2,0 g
Hidrolizado ácido de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g
Sangre de carnero desfibrinada	5 %

pH 7,3 ± 0,2

Procedimiento:

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y agregar 5% de sangre desfibrinada de carnero y distribuir a cajas de Petri hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

Caldo Infusión Cerebro y Corazón (BHI) (11)

Formula en gramo por litro de agua:

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión corazón vacuno	250.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Fosfato disódico	2.5 g

pH final: 7.4± 2

Procedimiento:

Suspender 37 g del polvo en un litro de agua purificada. Calentar a ebullición hasta disolver completamente. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Infusión Cerebro y Corazón (BHI) + LLS 8 % + PP 6.4 % (11)

Formula en gramo por litro de agua:

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión corazón vacuno	250.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Fosfato disódico	2.5 g

pH final: 7.4± 2

Procedimiento:

Disolver 80 g de LLS en 1000 mL de agua purificada, calentar si es necesario, adicionar 64 g de propilenglicol y agitar, luego suspender 37 g del polvo del BHI en la solución antes preparada. Calentar a ebullición hasta disolver

completamente. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Casina Soya Digerida (Casoy) ⁽¹¹⁾

Fórmula (en gramos por litro)

Tripteína	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Procedimiento:

Suspender 30 g del polvo en un litro de agua purificada. Calentar a ebullición hasta disolver completamente. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Nutritivo ⁽¹¹⁾

Fórmula (en gramos por litro)

Pluripeptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Agar	15.0 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Procedimiento:

Suspender 31 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO N° 4
PRUEBAS BIOQUÌMICAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÒN
DE *Streptococcus mutans* ATCC25175

A. TINCIÓN GRAM ⁽¹¹⁾

- Preparar un frotis del cultivo de *S. mutans* ATCC 25175, en dos portaobjetos.
- Adicionar solución de cristal violeta y dejar durante 1 minuto y lavar suavemente con agua destilada.
- Adicionar solución de lugoly dejar durante 1 minuto y lavar suavemente con agua destilada.
- Decolorar con solución Alcohol-Acetona e inmediatamente lavar con agua destilada.
- Adicionar solución de safranina, y dejar durante 1 minuto y lavar suavemente con agua destilada.
- Observar a la preparación en microscopio y verificar la coloración desarrollada por la muestra.

B. PRUEBA DE CATALASA ⁽¹¹⁾

- Adicionar una gota de suspensión de *S. mutans* ATCC 25175 sobre un portaobjetos.
- Adicionar una gota de peróxido de hidrogeno al 3%
- Observar
- Interpretar los resultados. Resultado positivo si inmediato a la adición del peróxido de hidrógeno hay presencia de burbujas de lo contrario la prueba es negativa.

C. PRUEBA DE OXIDASA ⁽¹¹⁾

- Adicionar una gota de suspensión de *S. mutans* ATCC 25175 sobre un papel filtro.
- Adicionar una gota del reactivo para oxidasa (p-amino-N-dimetil-anilina)
- Observar.
- Interpretar los resultados. La formación de un color morado indica prueba positiva, de lo contrario es prueba negativa.

D. PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER (11)

- Inocular el *S. mutans* ATCC 25175 en dos tubos con medio VP, incubar a 37 °C por tres días en anaerobiosis.
- Adicionar en cada tubo 0.6 mL de 1-naftol 5% y 0.2 mL de KOH 40%. Agitar y dejar reposar por 10 -15 minutos, observar color formado en la superficie.
- Interpretar los resultados. Formación de color rojo en la superficie indica prueba positiva, de lo contrario la prueba es negativa.

E. PRUEBA DE CRECIMIENTO EN NaCl 6.5 % (11)

- Inocular el *S. mutans* ATCC 25175 en dos tubos con Casoy + NaCl 6.5% e incubar a 37 °C por 24 horas en anaerobiosis.
- Realizar la lectura y observar ausencia o presencia de crecimiento del inculo de prueba.
- Interpretar resultados. No debe de haber crecimiento del inculo de prueba después de 24 horas

F. PRUEBA DE HEMOLISIS GAMMA (γ) (11)

- Sembrar el *S. mutans* ATCC 25175 en dos placas con AMH + 5 % de sangre defibrinada de carnero
- Incubar las placas en anaerobiosis a 37 °C por 24 a 48 horas.
- Realizar la lectura de las placas y observar si hay presencia o ausencia de halos en las placas de agar.
- Interpretar los resultados. Si no hay presencia de halos en las pacas de agar indica que es Hemolisis γ (No Hemolisis)

ANEXO N° 5
CERTIFICADO DE ANALISIS DE LA CEPA

Gibson Bioscience
1040 Manchester Street
Lexington, KY 40508
800-477-4763 www.gibsonlabs.com

SPECIFICATIONS

Microorganism: *Streptococcus mutans*
Lot: 4178501
Expiration: 2015/12/11
Reference: ATCC* 25175
Purity/QSR: Pure
Recovery/QSR: >1000 CFU's per Unit

Passages: <= 4 from Reference
Production Date: 2014/06/27
Release Date: 2014/07/10

PERFORMANCE

Microscopic Features: Gram positive cocci

PHENOTYPIC FEATURES

Crystal Violet	Negative	Raffinose	Positive
Micrococcus Screen	Positive	Bacitracin	Positive
Nitrate	Negative	Pyruvate	Negative
Novobiocin	Negative	Hemolysis	Negative
PNP-B-D-Glucuronide	Negative		
Indoxyl Phosphatase	Negative		
Voges-Proskauer	Positive		
Optochin	Positive		
Phosphatase	Negative		
40% Bile Esculin	Positive		
L-Pyrrolidonyl-B-naphthylamide	Negative		
Arginine	Negative		
PNP-B-D-Galactopyranoside	Positive		
Urea	Negative		
Mannitol	Positive		
Lactose	Positive		
Trehalose	Positive		
Mannose	Positive		
NaCl 6.5%	Negative		
Sorbitol	Positive		
Arabinose	Negative		
Ribose	Negative		
Inulin	Positive		

Madison Wells

MicroScan Biotype: 206457234

Probability: 99.83%

Quality Control/Quality Assurance *JWB* 07.10.2014
Certifies product has been tested and meets above specifications.

Streptococcus bovis group

*ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

FQA-059-00

Figura N° 22. Certificado de análisis de la cepa de *Streptococcus mutans*

ANEXO N° 6
ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE DILUCIONES PRUEBA DEL AEO

A. Preparación de la solución Stock



B. Preparación de soluciones de trabajo del AEO

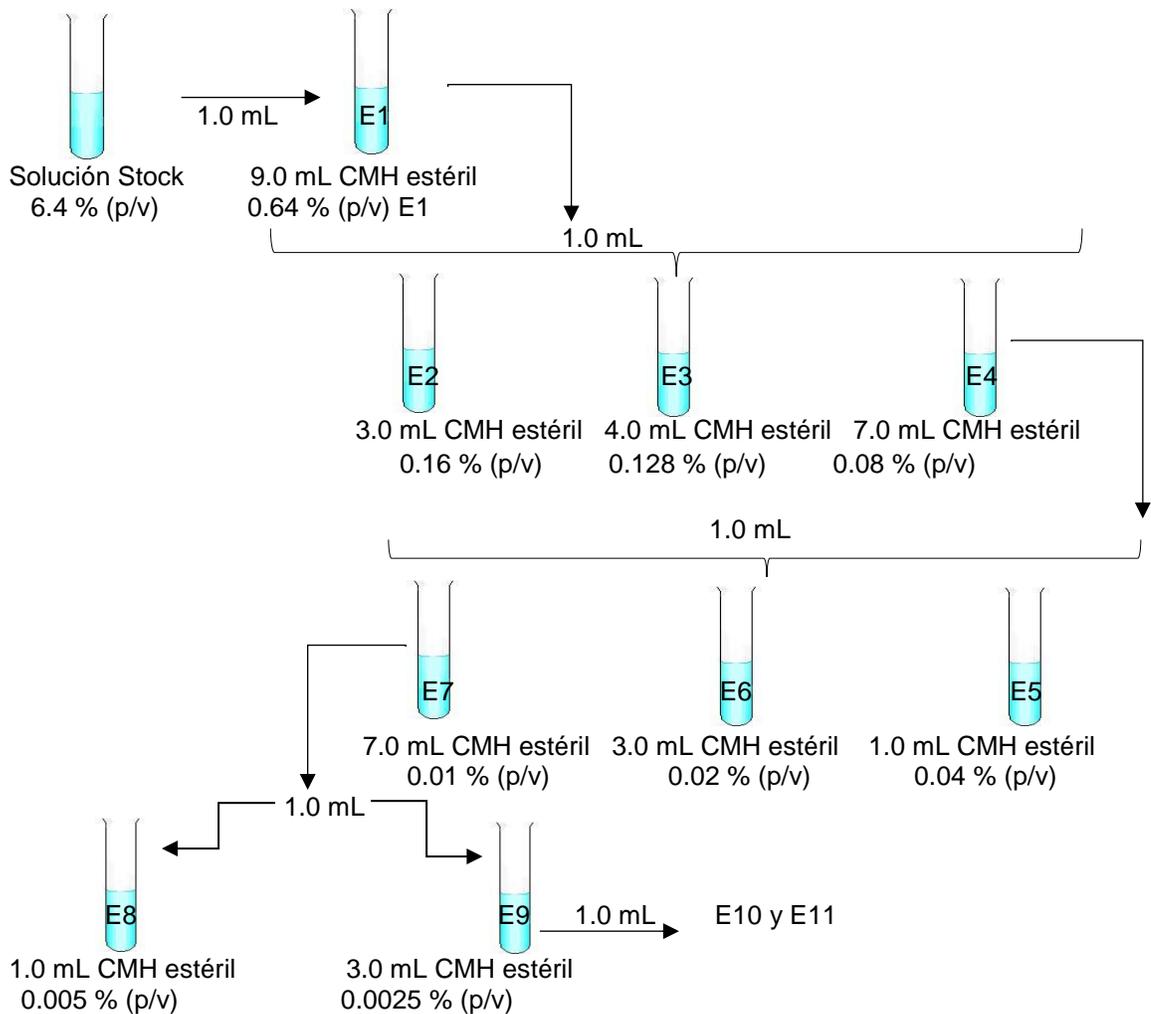


Figura N° 21. Esquema de preparación de diluciones prueba del AEO para ensayo de CIM sobre *S. mutans* ATCC 25175

ANEXO N° 7

**DATOS CRUDOS (RAW DATA) DE LAS ABSORBANCIAS DE LOS
POCILLOS DE LA MICROPLACA DE 96 POCILLOS ANTES Y DESPUES DE
INCUBAR**

Absorbancias antes de incubar microplaca

Humareader	:K	SN	1612	(80)	06.00.63	00:08:40						
ABSORBANCE MODE	12	PAGE	1		06.00.63	00:08:53						
LOT NUMBER:	01	EXP. DATE:	08/09/12	ANALYST:	Moses Escobar							
WAVELENGTHS=630NM												
READ MODE: 1 to 12												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	0.001-0.014-0.016	0.021	0.071	0.041	0.005-0.018-0.029	0.006-0.033-0.031						
1B	-0.030-0.027	0.014-0.003-0.010-0.025	-0.004-0.008	0.011-0.030-0.043-0.018								
1C	-0.016-0.007-0.018	0.105	0.000	0.029-0.016-0.004-0.037	-0.008-0.039-0.028							
1D	-0.008	0.019	0.000-0.012	0.007-0.010-0.028	0.085	0.025-0.016-0.048-0.050						
1E	-0.047-0.022-0.014	0.074	0.010	0.072	0.008	0.007-0.046	0.004-0.054	0.004				
1F	-0.012-0.001	0.016-0.014	0.001-0.048	0.065	0.000	0.049-0.018-0.037-0.006						
1G	-0.014-0.009	0.042	0.096	0.019	0.059-0.012	0.031-0.009-0.007-0.013	0.005					
1H	-0.016	0.096	0.078-0.027	0.043	0.092	0.087	0.053	0.033-0.048	0.003	0.008		

Absorbancias después de incubar microplaca

Humareader	:K	SN	1612	(80)	06.00.63	00:26:25						
ABSORBANCE MODE	12	PAGE	1		06.00.63	00:26:31						
LOT NUMBER:	01	EXP. DATE:	09/09/15	ANALYST:	Ana Torres							
WAVELENGTHS=630NM												
READ MODE: 1 to 12												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	-0.008-0.023-0.022-0.013-0.019-0.004-0.034	0.231	0.304	0.312	0.281	0.011						
1B	-0.023-0.022	0.010-0.009-0.007-0.023-0.005-0.004	0.017-0.004	0.326	0.009							
1C	-0.022-0.008-0.018	0.006-0.016	0.005-0.019	0.258	0.326	0.354	0.332	0.001				
1D	0.004-0.036	0.005-0.020	0.003-0.012-0.028	0.010	0.037	0.010	0.329-0.008					
1E	-0.043-0.018-0.014-0.009-0.026-0.005	0.002	0.286	0.334	0.358	0.290	0.029					
1F	-0.009-0.006-0.005-0.014-0.002-0.054	0.012-0.002	0.048-0.012	0.340	0.017							
1G	-0.009-0.004-0.030	0.002-0.007-0.005-0.016	0.262	0.378	0.404	0.339	0.037					
1H	-0.014-0.008	0.058-0.028	0.042	0.051	0.087	0.048	0.037-0.030	0.329	0.036			