UNIVERSIDAD SEÑOR DE SIPÁN

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

TESIS

Actividad antibacteriana, *in vitro,* del extracto hidroalcoholico de *origanum vulgare* sobre *streptococcus mutans* atcc 25175tm.

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

Autor:
Bach. Neyra Guerrero, Jesús Percy.

Asesor:
Mg. CD. Paola Beatriz La Serna Solari.

Línea de Investigación:
Respuestas biológicas en terapias estomatológicas.

Pimentel – Perú
2017

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, *In Vitro,* DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Origanum vulgare* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM.

Aprobación de Tesis

Mg. CD. Paola Beatriz La Serna Solari.

Asesor metodólogo

Mg. CD. Paola Beatriz La Serna Solari

Presidente del jurado de tesis

Mg.Blg. Zamora Mejía Luz Amalia

Secretario del jurado de tesis

Mg. Mblg. Pérez Delgado Orlando

Vocal del jurado de tesis

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis primeramente a mi Dios todo poderoso, quien me da la sabiduría e inteligencia cada día para superar mis metas y por guiarme en mi camino como profesional.

A MI MADRE, MI NOVIA Y MIS HERMANOS

Porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su amor, su apoyo incondicional y confianza, con la cual he podido cumplir mis objetivos como persona y profesional.

A MIS ASESORES

Por el apoyo constante y motivación, que me permitió culminar con satisfacción la presente tesis.

AGRADECIMIENTO

Primeramente a mi Dios por guiarme en mi camino profesional.

A mi madre por su amor, confianza y apoyo incondicional en la elaboración de esta investigación.

A mi novia por estar a mi lado en todo momento y ser la motivación más hermosa en vida.

A la Universidad Señor de Sipán por permitirme estudiar una carrera académica.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y autoridades que la dirigen.

A mi Escuela Profesional de Estomatología y Docentes, por guiarme y formarme profesionalmente.

ÍNDICE

DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTO iv
RESUMEN vi
INTRODUCCION viii
CAPITULO I: PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN 10
1.1 Situación problemática 10
1.2Formulación el problema 11
1.3 Justificación e importancia 11
1.4 Objetivos de la Investigación: 12
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO 13
2.1 Antecedentes 13
2.2 Marco Conceptual 16
2.2.1 Genero Streptococcus 16
2.2.1.1 Morfología: 16
2.2.1.2 Características generales 16
2.2.2 Streptococcus mutans 17
2.2.3 Composición química 24
2.2.4 Actividad Farmacológica de Principios activos y propiedades 24
2.2.5 Definición de términos básicos: 25
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO 26
3.1 Tipo y Diseño De La Investigación 26
3.1.1 Tipo de investigación: 27
3.1.2 Diseño de la investigación: 27
3.2 Población y Muestra: 27
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 35
4.1. Resultados en tablas y gráficos 35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40
ANEXOS 46

RESUMEN

Se estableció la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *S. mutans ATCC 25175*. Los estudios se basaron en 18 unidades experimentales y 6 concentraciones volumétricas (50mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml, 3,125mg/ml, 1,5625mg/ml). Se utilizó 2.5 g de residuo seco de *Origanum vulgar con el método de dilución doble seriada.* Para calcular el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* se usó el método modificado de Kirby Bauer o difusión en pozo. Los resultados obtenidos con el método de difusión en pozo se calcularon midiendo los diámetros de los halos de inhibición y se midió en milímetros con la ayuda de un calibrador vernier a las 24 horas. Los resultados determinaron que el *S. mutans* fue sensible en todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*, siendo la mayor concentración de inhibición a 50mg/ml, pues es lo que se puede observar en la formación de los halos de inhibición. Por lo tanto concluimos que el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* tiene actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

Palabras claves: Antibacteriano, Origanum vulgare, Streptococcus mutans.

ABSTRACT

Was established in vitro antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of Origanum vulgare on S. mutans ATCC 25175. The studies were based on 18 experimental units and 6 concentrations (50mg/ml, 25mg/ml, 12.5mg/ml, 6.25mg/ml, 3,125mg/ml, 1,5625mg/ml). We used 2.5 g of dry residue of Origanum vulgaris with the double-dilution method serial. To calculate the antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of Origanum vulgare is using the modified method of Kirby Bauer or dissemination in the well. The results obtained with the in-well diffusion method were calculated by measuring the diameters of the halos of inhibition was measured in millimeters with the help of a vernier caliper to the 24 hours. The results determined that the S. mutans was sensitive at all concentrations of the hydroalcoholic extract of Origanum vulgare, being the largest concentration of inhibition at 50mg/ml, it is what can be observed in the formation of the halos of inhibition. Therefore we conclude that the hydroalcoholic extract of Origanum vulgare has antibacterial activity on Streptococcus mutans ATCC® 25175TM.

Key words: Antibacterial, Origanum vulgare, Streptococcus mutans.

INTRODUCCION

La caries dental es una enfermedad tan antigua como el ser humano, cuyos indicios la posicionan entre las de más alta frecuencia en todo el mundo[1].

En el Perú se ha constituido como la enfermedad con más gravedad y es una perseverante preocupación para los programas de salud oral [1], ya que el nivel de incidencia sigue en aumento (95 de cada 100 personas en el Perú está afectado por esta enfermedad) [1].

La caries dental es una enfermedad formada por principios multifactoriales y además es la patología más prevalente de la cavidad oral, y se caracteriza por presentar un biodinamismo molecular, por lo que va a generar una interrelación inmediata entre los microorganismos y el órgano dentario. Es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial, siendo ésta uno de las primordiales causantes de la destrucción y deterioro de estructura dentaria[2]. Esta patología se establece en la segunda posición en la tabla de morbilidad general a nivel nacional y el tercer lugar en la etapa de la niñez con un 9.1%, dónde sólo es superada por las infecciones de las vías respiratorias agudas y las infecciones intestinales que ocupa el primer lugar en la tabla[1].

En la actualidad los métodos para controlar microorganismos orales, se basan en el empleo de productos químicos, dónde han sido reportador efectos colaterales

, por esta razón planteamos otra alternativa para el control de microorganismos, se trata de productos naturales, especies de plantas que componen una fuente de gran importancia en principios activos, que darán inicio a la formación de nuevos fármacos, que podrían ser empleados para el control de microorganismos de importancia estomatológica[2].

Entre los productos naturales que presentan principios activos con efecto antimicrobiano en cuyas investigaciones ha sido demostrado tenemos al *Origanum vulgare*, en esta investigación pretendemos buscar la actividad antibacteriana sobre *S. mutans*, uno de los más importantes microorganismos bucales causantes de la caries dental [2].

La importancia del desarrollo de esta investigación enfocará al estudio de nuevas investigaciones tecnológicas donde se podrán formular y diseñar nuevos productos que ayudaran a inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos bucales, eliminando los efectos colaterales y que puedan estar al alcance de toda la población en general.

CAPITULO I: PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Situación problemática

A nivel mundial, a lo largo de nuestra historia y en la actualidad gracias a la exploración y conocimiento de la naturaleza se viene presentando progresivamente la utilización de productos naturales para diversos tratamientos de enfermedades estomatológicas de importancia en salud pública [3].

La cavidad oral es un ecosistema de complejidad considerable que alberga innumerables microorganismos. Estos constituyen la flora oral del ser humano, la cual es altamente diversa. Dichos microorganismos orales son parte importante en la salud y la enfermedad oral [3.]

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes de la cavidad bucal. Es una enfermedad infectocontagiosa y transmisible, que produce desintegración progresiva de sus tejidos calcificados, debido a la acción de los microorganismos sobre carbohidratos fermentables. Se caracteriza por la desmineralización de la porción mineral y la disgregación de la parte orgánica. Se considera a *S. mutans* fundamental en el inicio y progresión de la caries dental y de otras enfermedades bucodentales [3].

Se ha establecido que el 90% de las personas, en las ciudades industrializadas son afectadas por infecciones órales de origen bacteriano. También se ha determinado que la mayoría de estas utilizan productos químicos para su control, productos que generalmente son de costo elevado, difícil acceso y comprobados que producen efectos colaterales[4].

Como se sabe, las plantas han sido utilizadas por la humanidad en todo el mundo desde tiempos remotos para controlar e incluso curar afecciones causadas por microorganismos. En la actualidad, a nivel mundial, existe un interés muy grande por investigar nuevas formas terapéuticas para combatir las afecciones en la cavidad oral, una de las más desarrolladas está relacionada con el uso de los extractos vegetales y otras sustancias inocuas para los tejidos orales [4].

Por consiguiente, existe la necesidad inmediata de trabajar en la prevención y tratamiento de enfermedades orales como la caries dental implementando métodos farmacológicos naturales que puedan eliminar los microorganismos que la causan, siendo uno de los principales el *S. mutans*[3.]

El propósito de esta investigación es evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *Origanum vulgare* "orégano", planta de origen natural cuyos estudios científicos realizados, dan a conocer las propiedades medicinales y bactericidas frente a diversos microorganismos [2], en este caso se determinará el efecto antibacteriano que este presenta sobre *S. mutans.*

1.2 Formulación el problema

¿Cuál es la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM?

1.3 Justificación e importancia

Actualmente, el problema de la resistencia bacteriana ha aumentado a nivel mundial, ésta dificultad tiene graves consecuencias en la economía de los países, ya que ha logrado hacer que las enfermedades se vuelvan crónicas y el costo vaya aumentando en el control de dichas patologías[5].

En la actualidad el uso de metodologías para la obtención de principios activos de origen vegetal se ha venido incrementando considerablemente. Es de mucha importancia para los investigadores diseñar alternativas de control natural contra los microorganismos patógenos que afectan la cavidad oral. Existen muchas investigaciones en las cuales se han aprovechado las propiedades farmacológicas de los vegetales para controlar bacterias patógenas[4].

Los productos naturales a base de plantas, han sido utilizados durante miles de años por las mismas propiedades nutricionales y medicinales que presentan,

despiertan interés en el control del factor bacteriano presente en la caries dental y otras enfermedades bucales[3].

Existen también diversas investigaciones acerca del efecto antibacteriano de aceites esenciales a base de *Origanum vulgare* frente a bacterias de la cavidad oral, sin embargo no existe evidencia del efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *S. mutans;* siendo este grupo bacteriano parte del biofilm cariogénico, constituye el extracto un intento para controlar el factor microbiológico de la caries dental[4].

En nuestro país y principalmente en nuestra localidad, no hay evidencia de investigaciones en el cual se haya evaluado la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre bacterias de interés bucodental.

1.4 Objetivos de la Investigación:

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

Objetivos Específicos

Identificar la mayor actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

Identificar la menor actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes.

Choca M. (2016, Ecuador, Quito), realizó un estudio con el objetivo de determinar la efectividad inhibitoria del Extracto hidroalcohólico de *cascara de papaya* al 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0% sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Empleó el método de Kirby Bauer para determinar el efecto inhibitorio de cada concentración para esto se realizaron 16 repeticiones por cada una. Se estableció además la Concentración Mínima inhibitoria mediante el método de microdilución en cajas para ELISSA para conocer cuál es la concentración con mejor acción. Obteniendo resultados que nos indican que las cepas de *S. mutans* ATCC® 25175™ son sensible a las concentraciones de 0.5%, 1.0%, 1.5% y resistentes a la concentración de 2%, del extracto y que la Concentración Mínima inhibitoria del mismo es del 2%. Concluyó que el extracto hidroalcohólico de *cascara de papaya* tiene acción inhibitoria sobre *S. mutans*[6].

Jiménez A. (2015, Ecuador, Quito**),** realizó un estudio con el objetivo de determinar y comparar la efectividad antibacteriana de extractos hidroalcohólico de ajo blanco, púrpura y Clorhexidina al 0,12% sobre cepas de Streptococcus mutans. Los extractos obtenidos por percolación se concentraron a 10%, 20%, 40% y 80%, después de activar la cepa se realizó la siembra a la escala 0,5 Mc Farland en 22 cajas Petri, 10 con agar Mueller Hinton más sangre al 2% y 12 con agar sangre, aplicando la técnica Kirby-Bauer, colocando las cuatro concentraciones mencionadas en cada caja, éstas fueron incubadas a 35±2ºC durante 24h al 5% de CO2; se midió los halos de inhibición a las 24h. Los resultados se analizaron con la prueba U de Mann Whitney y se concluyó que no existen diferencias significativas entre el ajo blanco y púrpura, teniendo mayor efecto antibacteriano con el púrpura al 80% con un promedio de 22,9mm, y el menor efecto con ajo blanco al 10% con un promedio de 11,2mm[7].

Alvarado G. (2015, Perú, Trujillo), realizó un estudio con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *propóleo* e *hipoclorito de sodio* frente a *Enterococcus faecalis*, determinó la CMI y CMB

mediante la técnica de turbidez óptica. Posteriormente se trabajó con 55 dientes que fueron divididos en tres grupos los cuáles fueron inoculados con *Enterococcus faecalis* y colocados en la estufa a 37° C por 24 horas. Luego el G1 = 22 dientes fueron irrigados con 2 ml. de extracto hidroalcohólico de propóleo a su CMB, el G2=22 dientes irrigados con 2 ml. de hipoclorito de sodio a su CMB y G3 (control) = 11 dientes irrigados con 2 ml. de solución salina fisiológica. Luego se obtuvo una muestra del interior de cada conducto con un cono de papel estéril el cuál se colocó en tubos de ensayo que contenían BHI y fueron incubados en estufa a 37° por 4 días, luego se obtuvo una muestra de esos tubos y se colocó en placas Petri con agar Mueller Hilton y se las puso a incubar en una estufa a 37° C por 24 horas. Los resultados de la CMI y CMB del extracto hidroalcohólico de propóleo fue 10% y la CMI y CMB del hipoclorito de sodio fue 20%. No hubo crecimiento bacteriano en las muestras obtenidas del G1 y G2. El análisis estadístico según la prueba de Mann Whitney determinó que no hubo diferencia significativa (p=1.000) entre el G1 y G2. Concluyó que no existe diferencia entre el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente al Enterococcus faecalis[8.]

Caqui, S. (2016, Perú, Lima)**,** realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto inhibidor del extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* (ajo) en comparación al PERIO-AID® frente a cepas *Streptococcus mutans*. Utilizó el método modificado de Kirby – Bauer, método de difusión en agar por pozos. La muestra estuvo conformada por 40 placas Petri con Agar Mueller-Hinton, donde se hicieron 8 pozos de 6mm. de diámetro y se vertieron 80 µl. del extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* (ajo) en sus distintas concentraciones, PERIO-AID® y agua destilada. Las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 35668) fueron reactivadas previamente a la colocación de las sustancias antimicrobianas. Para determinar el efecto inhibidor, se midió el diámetro de los halos de inhibición con un calibrador vernier a las 24 y 48 horas. Se utilizaron las pruebas de T-student, Anova y Tukey para el análisis de los resultados demostrando que el PERIO-AID® con halos de inhibición de 18,4 mm a las 24 horas y 18,1 mm a las 48 horas; posee significativamente mayor efecto inhibidor

que el extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* (ajo) (P<0,05), asimismo el PERIO-AID® en 24 y 48 horas mantiene su efecto inhibidor en el transcurso del tiempo. La presente investigación concluye que el extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* (ajo) posee efecto inhibidor sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 35668) al cabo de 24 y 48 horas manteniendo su efecto inhibidor en el transcurso del tiempo y el extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* (ajo) al 12 mg/ml. tiene menor efecto inhibidor que el PERIO-AID® frente a cepas de *Streptococcus mutans*[9].

Cosio H., Rodriguez H. (2017, Perú, Cusco), realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *albahaca*, con concentraciones al 5%, 10% y 15%, sobre *Actinomyces viscosus*, dónde comparó estos extractos con un Gold standard conocido universalmente en la odontología para el control de la placa bacteriana como es la Clorhexidina al 0,12%. Utilizó el método de dilución en pozo ,teniendo como muestra 20 placas Petri constituidas por agar sangre enriquecido con sangre de cordero al 5%, divididas en 5 grupos de estudio, (5 pozos expuestos al extracto al 5%, 5 pozos expuestos el extracto al 10%, 5 pozos expuestos al extracto al 15%, 5 pozos expuestos a la Clorhexidina al 0,12% como grupo patrón y los últimos 5 pozos expuestos al agua destilada como grupo control; para la evaluación a las 96h, 120h, 144h y 168h). Las mediciones se realizaron del cuarto al séptimo día de incubación a 37°C. En los resultados se determinó que el efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *albahaca* al 10% y al 15% es altamente significativo frente al *Actinomyces viscosus* expuesto a partir de las 120h, aumentando éste hasta las 168h. Así mismo se concluyó que a mayor concentración del extracto, mayor efecto antimicrobiano. La metodología usada permite confirmar la efectividad del extracto hidroalcohólico de albahaca con diferentes concentraciones frente al *Actinomyces viscosus*[10].

MARAVÍ I. (2012, Perú, Lima**),** realizó una investigación con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano y antifúngico 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 *cándida albicans* atcc 90028. Los aceites esenciales se obtuvieron por

el método de arrastre por vapor de agua. Se obtuvieron los siguientes resultados: De los tres aceites esenciales, al el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el Orégano, frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Cándida albicans* fue la Hierba Luisa. El aceite esencial de Orégano y Hierba Luisa tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos: Clorhexidina al 0.12% y Nistatina, a excepción de la Menta piperita (Menta) al 50% que su acción fue menor que los controles positivos. Concluyó que de los tres aceites esenciales, al 50% (8.53 mm) y al 100% (25.72 mm) el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el *Origanum vulgare* (Orégano) [11].

2.2 Marco Conceptual

2.2.1 Genero Streptococcus

Presentan una disposición en cadenas, son bacterias Gram positivas de forma esférica, taxonómicamente representa un complejo grupo causante de varias enfermedades. En su mayoría son anaerobios facultativos, se los clasifica por sus propiedades bioquímicas, antigénicas, y los tipos de hemolisis: alfa, beta, gama, algunos los clasifican en serogrupos antigénicos de la A-H, de K-M y de O-V, siendo de importancia medica los grupos A, B y C[12].

2.2.1.1 Morfología:

Estos cocos Gram positivos, normalmente presentan proteínas fibrilares de superficie, ocasionalmente encapsulados, que forman colonias altas, convexas y opacas, en medios que contienen sacarosa, tienen producción abundante de polisacáridos extracelulares. El género Streptococcus posee una variedad de especies que vive en una amplia gama de hospedadores incluidos humanos y animales domésticos, donde frecuentemente habitan como parte de la flora normal.[12].

2.2.1.2 Características generales

Homofermentadores

Es decir que el resultado final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico sin producción de gas, el aumento en el número de las especies de Streptococcus se ve estimulada por la presencia de CO2. Son además catalasa y oxidasa negativos, propiedad que sumada a la tinción Gram permite diferenciarlos de las especies de Neisseria[12].

Mecanismo de adaptación

Los Streptococcus poseen mecanismo tales como: la bomba de protones dependiente de ATP, y la capacidad de activar la enzima arginina desaminasa o la agmatina desaminasa para la producción de amonio, además en su estructura poseen una gruesa capa de peptidoglicanos, que se completa con la presencia de ácidos lipoteicoicos, diversas proteínas y polisacáridos[12].

2.2.2 Streptococcus mutans

En cavidad bucal la mayoría de los estreptococos pertenecen a los grupos salivarius, mutans, anginosus, sanguis, mittis, y de estos los que tiene relación con caries dental son: S. mutans que puede ser difundido con los serotipos d y g, y S. sobrinus que pertenecen al grupo de mutans[12].

Clarke en 1924 lo aísla de lesiones cariosas y le da este nombre por sus células de formas alargadas y ovaladas que le hacen pensar que son mutación de los estreptococos; acidogénico y acidúrico, produce diversos polisacáridos y ácido láctico a partir de sacarosa y otros azucares, fermenta manitol y sorbitol, puede crecer en presencia de sacarosa al 20%, resiste a la bacitracina, desciende el pH y produce lactato, formiato, acetato y etanol[12].

2.2.2.1 Síntesis de polisacáridos extracelulares.

De tipo glucanos insolubles y solubles, fructanos.

2.2.2.2 Síntesis de polisacáridos intracelulares.

Capacidad adhesiva por las proteínas salivales, que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, capacidad agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos[12].

Por este motivo muchos autores han sugerido al *S. mutans* como el principal agente causante de la formación de caries dental[12].

La patogenicidad del *S. mutans* está asociada a varios factores como: Acidogenicidad, Aciduridad, Acidofilicidad, Síntesis de glucanos y fructanos, Síntesis de polisacáridos intracelulares, Producción de dextranasa y fructanasa, Presencia de glucosiltransferasas, Proteínas de fijación celular, Proteínas fijadoras de glucano, que describiremos a continuación:

Liberación de ácido o acidogenicidad.

La alta afinidad de *S. mutans* por la sacarosa y su alta capacidad para transportarla hacen que este microorganismo sea el que probablemente contribuya más a la acidogénesis y subsecuente formación de caries, cuando la sacarosa es un componente significativo en la dieta de la persona. El *S. mutans* puede fermentar tales azúcares y producir ácido láctico en mayor proporción, ácido acético, fórmico y etanol. Esto hace que el pH baje y se desmineralice el esmalte dental[12].

Aciduricidad

El pH es un factor de estrés para las bacterias por lo cual desarrolla varios mecanismos ácidotolerantes. La aciduridad hace referencia a la capacidad que posee el microorganismo de producir ácido en un medio con pH ácido. *S. mutans* es más acidúrico que los demás tipos de *Streptococcus*[12].

Resistencia al medio ácido o acidofilicidad

El *S. mutans* tiene la habilidad de responder rápida y eficientemente a grandes cambios en su medio ambiente, razón por la cual puede resistir la acidez del medio bombeando los protones fuera de la célula. Éste es un elemento fundamental de dominancia del *S. mutans* en la placa dental cariogénica[12].

Síntesis de glucanos y fructanos

Por medio de enzimas como glucosiltransferasa y fructosiltransferasa (GTF y FTF), se producen a partir de carbohidratos de la dieta como la glucosa y la sacarosa, polisacáridos extracelulares de glucano y fructano. Éstos pueden ser solubles e insolubles en agua. Los glucanos de tipo insoluble pueden ayudar a la célula adherirse al diente iniciando fisura e indentaciones[13]. De no ser por mecanismos de acción como éste, las bacterias serían barridas y sus productos como el ácido láctico serían diluidos y neutralizados por la saliva[13].

Estos polímeros también pueden ser usados como reserva de nutrientes. El *S. mutans* usa la sacarosa para sintetizar glucanos unidos por enlaces (insoluble, base de la placa bacteriana) y (solubles, base de azúcar libre para el mantenimiento de los microorganismos que están en la película), a través de la acción de tres glucosiltransferasas secretadas que son codificadas por tres genes[14]. Se cree que el principal papel de estos glucanos es facilitar la acumulación de estos microorganismos y establecer una matriz extracelular de polisacáridos, la cual le da a los microorganismos resistencia contra las fuerzas mecánicas normales de limpieza. La glucosiltransferasa no solo cataliza la síntesis sino tiene la capacidad de unir estos polisacáridos[14]. El *S. mutans* también sintetiza una fructosiltransferasa, producto del gen FTF, la cual cataliza el clivaje (ruptura) de la sacarosa e incorporación de la fructuosa dentro del polímero fructano, compuesto principalmente por unidades de fructuosa unidas por enlaces beta-2. Los fructanos no facilitan la adhesión, ni agregación del Streptococcus mutans, los cuales tienen una vida relativamente corta dentro de la placa dental, debido a la gran hidrólisis enzimática por las enzimas fructano hidrolasas de las bacterias orales[15].

Síntesis de polisacáridos intracelulares

Entre éstos se encuentra el glucógeno, que sirve como reserva alimenticia y para mantener la producción de ácido durante largos períodos, aún en ausencia de consumo de azúcar. Igualmente, evita la acción tóxica del “azúcar asesino” cuando hay un aporte exógeno excesivo de sacarosa[16].

Producción de dextranasa y fructanasa

Además de movilizar reservas de energía, estas enzimas pueden regular la actividad de la glucosiltransferasa removiendo productos finales de glucano. Igualmente, permiten a los microorganismos mantener la producción de ácidos cuando no hay aporte exógeno de carbohidratos[16].

Proteína de adhesión celular (PAC)

Son unas proteínas antigénicas que se encuentran en la cápsula o pared del *S. mutans* e inician la adhesión a la superficie dental, lo cual es inusual, debido a que éstas se encuentran presentes en otros microorganismos en apéndices como en las fimbrias[17.]

Han recibido diversos nombres como Antígeno I/II, proteína B10, Spa 11, P1 1, R 13 ML-1 y PAC. Pueden tener varias funciones según la región de la proteína; agregación, región amino terminal hidrofóbica de la hélice a la de la molécula[17]. Adherencia en el carbono terminal de la región amino terminal rica en alanina. Por otro lado, pueden unirse también al colágeno en los túbulos dentinales, situación importante en el desarrollo de caries radicular. Se ha sugerido que esta molécula posee varios receptores, lo cual implica múltiples dominios de unión, además de que interactúa con el componente secretorio, la albúmina, aglutinina salivares y glicoproteínas[17].

El gen está constituido por 4695 pares de bases y codifica para una proteína de 1561 residuos de aminoácidos. Incluye una secuencia líder que va a lo residuos 1 al 38. Los residuos 1528 a 1533 están involucrados en la modificación postranscripcional que envuelve el rompimiento de los residuos del carbono terminal y la unión a la pared celular por medio probablemente de enlaces covalentes[18]. La región carboxilo terminal está compuesta por un dominio hidrofílico rico en residuos de glicina y prolina que atraviesa la pared, un motivo consenso LPNTGV, un dominio hidrofóbico que atraviesa la membrana con residuos de lisina[18].

La parte menos conservada está alineada entre los residuos 500 y 900. En contraste, la región N terminal está particularmente bien conservada y corresponde a los residuos 121 a 477. Este segmento de alanina se le conoce como región A

por ser rica en alanina. En ella se hallan la regiones de mayor interés que son las comprendidas entre los residuos 301 a 319, 361 a 377, siendo los segmentos más importantes porque poseen los epítopes (fragmento de la proteína que reconocen los blancos sobre los que ésta actúa) para linfocitos B y T. La estructura secundaria sugiere a la región A en el terminal amino de la molécula presenta 7 residuos periódicos y esto es lo que forma la hélice enrollada en espiral. Los residuos de alanina están agrupados formando una región hidrofóbica que gira dos veces alrededor de la hélice. La porción central incluye una serie de repeticiones de una secuencia de 39 residuos ricos en prolina (residuos 816 a 1213). A ésta se le conoce como región P, la cual se cree que es la región más relacionada con la unión entre la superficie de la proteína y los componentes salivales[19].

En varios estudios efectuados en la década de los ochenta se sugirió que por homología de las secuencias (segmentos de cadenas de aminoácidos iguales entre dos proteínas diferentes), se podría presentar reactividad cruzada entre proteína de adhesión celular (PAC) y las proteínas del músculo cardíaco, lo cual podría llevar a enfermedades autoinmunes. Se concluyó que la capacidad del S. mutans para inducir anticuerpos de reactividad cruzada no es causada por la proteína PAC, sino por otros antígenos de la pared celular de esa bacteria[20].

Como muestran diversos estudios realizados hasta el momento, varias secuencias de la proteína PAC han sido determinadas como inmunonógenos y se ha propuesto sus usos como antígenos vacunales, a pesar de haberse comprobado su capacidad inmunogénica en animales, no se ha comenzado la experimentación con esa proteína en humanos[20].

Glucosiltransferasas

Como ya se mencionó antes, las glucosiltransferasas del *S. mutans* juegan un papel importante en la cariogenicidad de esta bacteria, esto es debido a la habilidad de estos microorganismos para sintetizar glucanos adhesivos los cuales están relacionados con la acumulación y adherencia de las bacterias de la placa sobre la superficie del diente[20].

Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs)

Son productos extracelulares que unen o asocian glucanos en presencia de sacarosa y por esto se encuentran involucradas en los procesos de formación de placa dental bacteriana cohesiva. Teóricamente, las proteínas fijadoras de glucanos son importantes en el ámbito molecular de la patogénesis de la caries dental por *S. mutans*[20]. Todas las proteínas fijadoras de glucanos muestran afinidad por glucanos ricos en enlaces alfa-1,6. *S. mutans* sintetiza al menos dos proteínas fijadoras de glucanos que no tiene actividad enzimática de glucosiltransferasas, una de ellas es secretada como una proteína de 74 kDa (GBP74) que es la predominante cuantitativamente entre las obtenidas del sobrenandante de cultivos de *S.mutans*[20].

Smith y colaboradores (1994) aislaron y purificaron una nueva proteína fijadora de glucanos S. mutans cuyo peso es de aproximadamente 59 KDa, por lo que se denominó GBP. Determinaron que esta proteína es diferente de la GBPs, dado que presenta diferente tamaño, difiere en su posición de elución en gradiente salino y los antisueros para GBP 59 y GBP 74 no presentan reacción cruzada. En el mismo estudio concluyeron que aparentemente la GBP 59 es inmunogénica en humanos, ya que se encontraron anticuerpos Ig A en muestra de glándula parótida de adultos que mostraban reacción con GBP 59 en ensayos de inmunoabsorbancia. Igualmente, pudieron confirmar la actividad de fijación de glucanos de la GBP 59 y que la GBP 59 es estructural y antigénicamente diferente de la GBP 74 siendo capaz de inducir niveles significativos de Ig A salival en humanos. El antisuero para GBP 74 reaccionó también con epítopes de la GBP 87 del *S. sobrinus*, indicando que existe relación estructural entre GBPs de diferentes especies de *Streptococcus*[21].

Banas y colaboradores (1989) determinaron la secuencia de nucleótidos del gen GBP, que codifica alfa para la GBP de *S. mutans*, encontrando que está constituido por 1689 bases con un péptido señal de 35 aminoácidos[22]. El peso molecular de la proteína procesada se calculó en 59,039 KDa. Se encontró que las repeticiones son homologas a secuencias hipotéticamente involucradas en la unión de glucanos en la GTF-I DE *S. downei*. Y también a secuencias de proteínas codificadas por los

genes gtfB y gtfC de *S. mutans*. Proponen que estas secuencias repetidas pueden representar segmentos peptídicos que son importantes en la unión de glucanos y que pueden ser distintos entre las GBPs de otras bacterias habitantes de placa o cavidad oral[22].

2.2.2 Taxonomía del *Origanum vulgare*

Clasificación Botánica[23]

Phylum: Euphyta.

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledones

Orden: Tubiflorae

Familia: Labiatae

Género: Origanum

Características

El orégano perteneciente al género Origanum, familia Labiatae, agrupa plantas herbáceas, perennes, matosas, originarias de los países mediterráneos. Crece espontánea en los lugares soleados y áridos hasta 2000 m.s.n.m., es cultivada cómo planta aromática y por sus propiedades terapéuticas[23].

Etimología

El nombre deriva del griego "oros = montaña" y de "gamos = resplandor, delicia" vale a decir "alegría de la montaña" porque al estado espontáneo pinta con sus flores las pendientes montañosas y ondulados pedregosos y soleados[23].

Hábitat y distribución

Origanum vulgare L. (Orégano) es una planta perenne, perteneciente a la familia Lamiaceae. Originario de la región del Mediterráneo, también cultivado en Europa, Asia y Taiwan y en América del Sur. Su principal productor es Chile, pero también es producido en Bolivia, Perú, y en menor escala, en Argentina y Uruguay[24].

Usos

La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores[23].

2.2.3 Composición química

El orégano presenta como componente principal un aceite esencial, con más de 34 compuestos activos, de los cuales los fenoles como carvacrol, timol, ã-terpeno y p-cimeno pueden alcanzar entre 80,2 y 98 % de la composición del aceite[24].

2.2.4 Actividad Farmacológica de Principios activos y propiedades

El orégano (*Origanum vulgare*) posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas, y sobre todo se caracteriza por la potente acción de sus principios activos carvacrol y timol que le otorgan a esta planta un gran poder antibacteriano[25].

Timol

Es una sustancia cristalina incolora con olor característico que está presente en la naturaleza en los aceites esenciales del tomillo y del orégano así mismo pertenece al grupo de los terpenos por ultimo su isómero es el carvacrol y se caracteriza por su poder desinfectante y anti fúngica[26].

Carvacrol

También llamado cymophenol, es un fenol monoterpenoideeste, es una molecula con propiedades antibacterianas de la familia de los fenoles, el carvacrol está presente en el aceite esencial del *Origanum vulgare* y en el aceite de tomillo[26, 27].

2.2.5 Definición de términos básicos:

Streptococcus mutans: bacteria Gram positiva, esférica, anaeróbica facultativa, pertenecientes al grupo de bacterias acidolácticas[28].

Placa bacteriana: película fina y blanda de detritus alimentarios, mucina y células epiteliales muertas depositadas sobre los dientes, que proporciona crecimiento para varias bacterias. Contiene calcio, fósforo y otras sales, polisacáridos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos [28].

Extracto Alcohólico: sustancia concentrada de una planta o semilla con un disolvente (en este caso alcohol), en proporción variable, capaz de solubilizar los principios activos[29].

Efecto antibacteriano: Inhibición en el desarrollo o crecimiento de la bacteria[29].

Halo de inhibición: Zona alrededor de un disco o pozo con antibiótico en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen[29].

In vitro: Producido en el laboratorio por métodos experimentales[30].

U.F.C: Número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia[30].

Concentración: Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es el mol por metro cúbico (mol/m3)[30].

Bactericida: Sustancia de origen natural o sintetizada químicamente que es capaz de destruir bacterias[30].

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y Diseño De La Investigación

3.1.1 Tipo de investigación:

Básica Cuantitativa.

3.1.2 Diseño de la investigación:

Según la intervención del investigador:

Experimental de tipo estimulo creciente.

Según la planificación de la medición de la variable de estudio:

Prospectivo.

Según el número de mediciones de la variable de estudio:

Longitudinal.

Según el número de variable de interés:

Analítico.

3.2 Población y Muestra:

Población:

Un Cultivo puro *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM proporcionado por el laboratorio de microbiología de la facultad de ciencias de la salud de la USS.

Muestra:

Estuvo conformada por 100 µL de una suspensión bacteriana obtenida a partir de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, esta suspensión fue equivalente al tubo N° 0,5 (1,5x108 UFC/mL) según espectrofotómetro.

3.3 Unidad de Análisis

La unidad de análisis estuvo constituida por una placa Petri sembrada con 100 µL de suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

3.4 Cálculo del número de duplicados de unidades de ensayo

El número de duplicados para cada ensayo se determinó aplicando la siguiente fórmula estadística.

$$U.E = D \times E \times C \times R$$

Dónde,

U.E= Unidades Experimentales.

D = Número de Diluciones.

E = Número de Extractos.

C= Número de Cepas.

R= Número de Repeticiones.

Así, D = 6; E= 1; C = 1; R= 3

Reemplazando la ecuación propuesta se obtuvo 18 unidades experimentales u observaciones.

Se utilizaron 6 unidades de análisis, en cada repetición de la investigación.

3.5 Criterios de Inclusión

La cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM se identificó fenotípicamente por el equipo automatizado *Microscan.*

3.6 **Criterios de exclusión**

Microplacas que mostraron contaminación microbiana externa o interna.

3.7 Hipótesis:

Existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare,* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM.

3.8 Variables

Variables Independientes

6 concentraciones volumétricas de extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare "orégano"*

Variable Dependiente:

Actividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

3.9 Operacionalización de Variables

VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	TIPO DE VARIABLE	INDICES	TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS
Actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM	Formación de halos y recuento de unidades formadoras de colonia UFC	Crecimiento de la bacteria	Cuantitativa	Zona de inhibición (mm)	Siembra en superficie Agar Mueller Hinton
VARIABLE INDEPENDIENTE	**DIMENSION**	**INDICADOR**	**TIPO DE VARIABLE**	**INDICES**	**TÉCNICA**
Extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*	Concentraciónes	Concentración 1 Concentración 2 Concentración 3 Concentración 4 Concentración 5 Concentración 6	cuantitativa	(mg/mL)	Dilución doble seriada

3.10 Método, técnicas e instrumentos de recolección de datos

Diseño del estudio es experimental

3.11 Método experimental[31]

Es un tipo de método de investigación en el que el investigador controla deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas, está basado en la metodología científica. En este método se recopilan datos para comparar las mediciones de comportamiento de un grupo control, con las mediciones de un grupo experimental. Las variables que se utilizan pueden ser variables dependientes (las que queremos medir o el objeto de estudio del investigador) y las variables independientes (las que el investigador manipula para ver la relación con la dependiente). Además debemos controlar todas las demás variables que puedan influir en el estudio (variables extrañas)[31].

3.12 Método de difusión en pozo[32]

Método de difusión en agar es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Con un variante al método anterior, para este método se emplea un sacabocado para realizar pozos en el agar.

3.13 Preparación del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*

- Se llevó a licuar 1kg de las hojas de *Origanum vulgare*
- El material en polvo se mantuvo en botella de vidrio ámbar hermético.
- Este material en polvo se utilizó para extracción adicional.
- Se pesaron 250 g de polvo *Origanum vulgare* y se agregaron 800 mL de alcohol al 70 %.
- El producto fue filtrado con papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto purificado libre residuos.

- El extracto resultante fue distribuido en placas Petri y fue secado en estufa a una temperatura de 50°C hasta sequedad. (Anexo 2, Fig.1).
- El residuo seco obtenido 2.5g, posteriormente fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su reactivación en agua destilada estéril para su posterior uso. (Anexo 2, Fig.2.).

3.14 Preparación del agente antibacteriano.

Siguiendo las recomendaciones y normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) [32], para evaluar la potencia puede expresarse como porcentaje o en unidades de mg/mL, µg/mL µg/mg (p/p).

- El residuo seco 2.5g se disolvió en 50 mL de agua destilada estéril, obteniéndose una solución madre.
- Se realizó diluciones doble seriadas a partir de la solución madre, obteniéndose 6 diferentes concentraciones (50mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml, 3,125mg/ml, 1,5625mg/ml). . (Anexo 3, Fig.1.).

3.16 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: Agar Müeller Hinton según MERCK y caldo Müeller Hinton según MERCK, el primero para el recuento de UFC y el segundo para la suspensión bacteriana. Se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante [31, 32].

3.17 Preparación y Estandarización del Inoculo de *Streptococcus mutans*.

Se realizó siguiendo el método descrito por Al – Delaimy, en 1970, que utiliza la técnica turbimétrica (nefelómetro de McFarland) A partir del cultivo puro de 18 horas de

Streptococcus mutans ATCC®25175TM, se seleccionaron 3 colonias bien aisladas de igual morfología y se preparó una suspensión en 5 mL de agua destilada estéril.

Con ayuda del espectrofotómetro (longitud de onda: 600 nm), se ajustó a una densidad óptica de 0,08- 0,1 equivalente a la turbidez del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland equivalente a una concentración aproximadamente de 1,5 x 10^8 UFC/mL, que fue corroborada en un recuento en medio de cultivo sólido [31, 32, 33]. (Anexo 4, Fig.1.).

3.18 Actividad Antibacteriana

3.18.1 Método de difusión en pozos[32]

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, una torunda de algodón se sumerge en ella. La torunda debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de agar Müeller -Hinton por rayado con la torunda sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.
- La tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que un exceso de humedad.
- Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inoculo no estandarizado.

Sobre las placas sembradas:

- Se realizaron 6 perforaciones de 6 mm de diámetro, con un sacabocado.
- Se colocaron 50 µL en cada pozo, con ayuda de una micropipeta, el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* a diferentes concentraciones.

- Cada pozo fue marcado con su respectiva identificación, se selló con parafilm y se incubó las placas a 37 °C, por un periodo de 24h. (Anexo 5, Fig.1.).

3.19 Lectura e interpretación de resultados[34]

- Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.
- El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas
- Los tamaños de las zonas de inhibición fueron medidos con un Vernier en milímetros fueron interpretados según orientaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). (Anexo 5, Fig.2.).

3.20 Recolección de Datos[31,33,34]

Se realizó el recuento directo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) crecidas. Dichos datos se registraron en un formato diseñado para este fin (Anexo I).

3.21 Análisis estadísticos de resultados de datos

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS V20. Se aplicó un ANOVA (análisis de varianza) y un análisis de significancia (determinación de DMS) entre los ensayos problema, y se determinó las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados[35].

3.23 Criterios éticos

La presente investigación se realizó cumpliendo las normas y recomendaciones

otorgadas por la OMS (Organización Mundial de la Salud) [36], cumpliendo con la correcta manipulación y eliminación de los microorganismos.

3.24 Criterios de rigor científico

La metodología empleada fue validada a nivel internacional, cuyos procedimientos aseguraron la fidelidad de los resultados. La presente investigación cumplió todos los criterios de rigor científico, siendo por tanto una investigación inédita y debe ser considerada como tal.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Resultados en tablas y gráficos

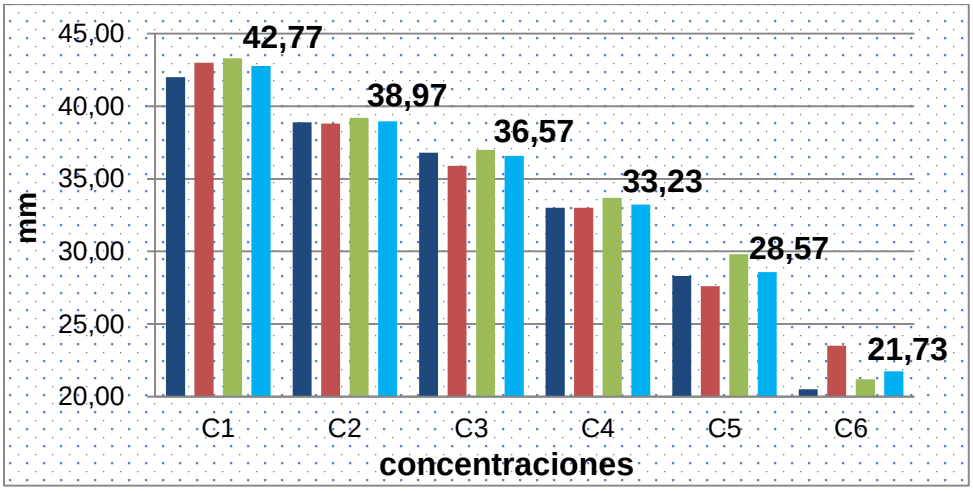
En la Tabla Nº 1 y Gráfico Nº 1; se observa, La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

Tabla Nº 1.

Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

Nº	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*	Halos de inhibición			Valor promedio de halos de inhibición en mm
		P1	P2	P3	
C1	50 mg/ml	42 mm	43 mm	43.3 mm	**42.77**
C2	25 mg/ml	38.9 mm	38.8 mm	39.2 mm	**38.97**
C3	12,5 mg/ml	36.8 mm	35.9 mm	37 mm	**36.57**
C4	6,25 mg/ml	33 mm	33 mm	33.7 mm	**33.23**
C5	3,125 mg/ml	28.3 mm	27.6 mm	29.8 mm	**28.57**
C6	1,5625 mg/ml	20.5 mm	23.5 mm	21.2 mm	**21.73**

Grafico Nº 1. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 6 concentraciones volumétricas (C1=50mg/ml, C2=25mg/ml, C3=12,5mg/ml, C4=6,25mg/ml, C5=3,125mg/ml, C6=1,5625mg/ml) del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*.



En la Tabla Nº 2 y Gráfico Nº 2; se observa, la mayor actividad antibacteriana del

extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare,* y se encuentra en la concentración de 50 mg/ml y es de 42.77mm.

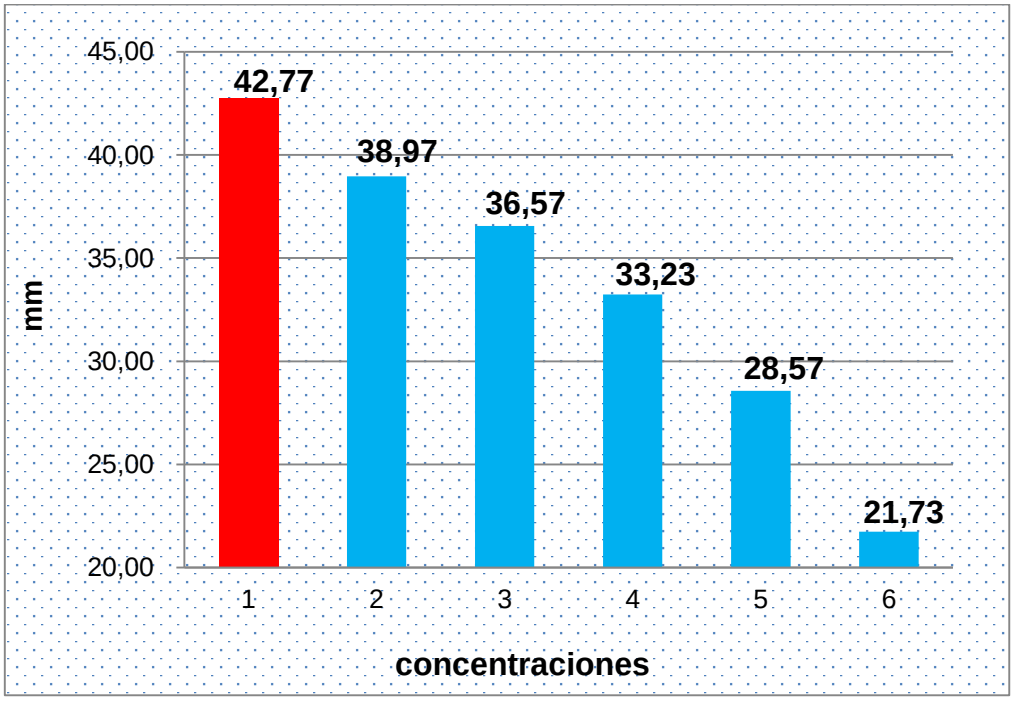
Tabla Nº 2.

Mayor actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* con las diferentes concentraciones del extracto.

Nº	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*	Valor promedio de halos de inhibición en mm
C1	**50 mg/ml**	**42.77**
C2	25 mg/ml	**38.97**
C3	12,5 mg/ml	**36.57**
C4	6,25 mg/ml	**33.23**
C5	3,125 mg/ml	**28.57**
C6	1,5625 mg/ml	**21.73**

Grafico Nº 2.

Halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* de la concentración de mayor eficiencia del extracto de *Origanum vulgare* y las demás concentraciones del extracto.



En la Tabla Nº 3 y Gráfico Nº 3; se observa, la menor actividad antibacteriana del

extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare,* y se encuentra en la concentración de 1,5625 mg/ml y es de 21.73mm.

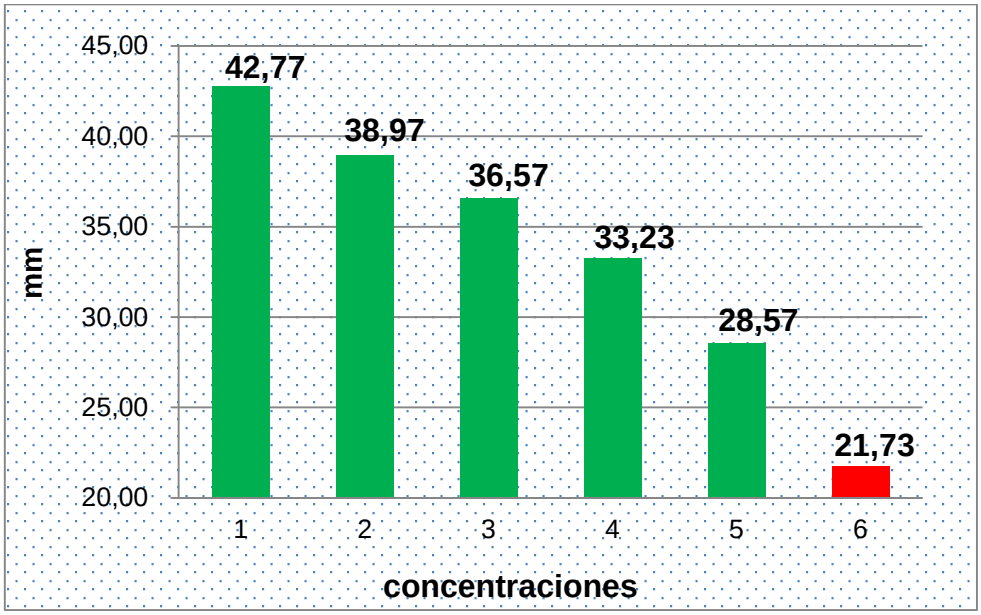
Tabla Nº 3.

Menor actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* con las diferentes concentraciones del extracto.

Nº	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*	Valor promedio de halos de inhibición en mm
C1	50 mg/ml	**42.77**
C2	25 mg/ml	**38.97**
C3	12,5 mg/ml	**36.57**
C4	6,25 mg/ml	**33.23**
C5	3,125 mg/ml	**28.57**
C6	1,5625 mg/ml	**21.73**

Grafico Nº 3.

Halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* de la concentración de menor eficiencia del extracto de *Origanum vulgare* y las demás concentraciones del extracto.



En la Tabla Nº 4. Se observa el análisis de varianza de un factor para una muestra con un nivel de significancia de 0,05. Por otro lado; el valor de prueba F del análisis de varianza es altamente significativo ($p < 0.05$) demostrando la influencia que tiene las concentraciones del extracto con respecto a la actividad antibacteriana.

Tabla Nº 4.

Análisis de varianza de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans*

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Entre grupos	863.722778	5	172.744556	218.6639944	2.36753E-11
Dentro de los grupos	9.48	12	0.79		
Total	873.202778	17			

2.3675E-11 ≡ 0.00 **P**

Nivel de significancia: 0,05

Si el valor de P es menor que el nivel de significancia (P < 0,05) se acepta la hipótesis investigación.

Valor P **0.00 <** alfa 0.05

Entonces el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare,* si tiene actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM

4.2. Discusión de resultados

El orégano con su nombre científico *Origanum vulgare*, perteneciente a la familia Lamiaceae, ha sido utilizado por muchos años en la medicina tradicional para problemas digestivos, dolores premenstruales, tos, entre otros. Es una planta muy utilizada gracias a su acción farmacológica que esta posee, por tanto ha sido reportada su actividad antibacteriana a partir de sus aceites esenciales presentes

en las hojas, frente a microorganismos de interés estomatológico, como en el caso de Maraví[11] quien determinó el efecto antibacteriano de 3 aceites esenciales: orégano, menta y hierba luisa sobre s. mutans, dónde concluyó que de los tres aceites esenciales, al 50% (8.53 mm) y al 100% (25.72 mm) el que tuvo mayor efecto antibacteriano sobre *S. mutans* fue el orégano [11], esta evidencia da a conocer la actividad antibacteriana que presenta esta planta, coincidiendo con los resultados de este estudió experimental, donde se utilizó otro método de extracción de principio activo del *Origanum vulgare* opuesto al ya mencionado.

En la presente investigación se determinó la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *de Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, bacteria participante del inicio y progresión de la caries dental.

Por tanto en los resultados del presente estudio se evidenció que el extracto hidroalcohólico de *O. vulgare* presentó actividad antibacteriana frente a *S. mutans* ATCC 25175™ en sus 6 diferentes concentraciones (50mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml, 3,125mg/ml, 1,5625 mg/ml), este hallazgo demuestra que *O. vulgare* presenta principios bioactivos que participan en la inhibición del crecimiento bacteriano. Cabe mencionar que en la concentración de 50 mg/mL o su equivalente al 5% presentó un halo inhibición mayor, equivalente a 42,7 mm, este hallazgo demuestra su poder antibacteriano en comparación a lo publicado por Jiménez[7], que demostró la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico del ajo púrpura a una concentración del 80 % produciendo un halo de inhibición de 22,9mm sobre *S. mutans*[7]. Choca[6] que evaluó la efectividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de cascara de papaya al 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0%, obteniendo halos de inhibición de 18,02mm (0.5%); 16,08mm (1.0%); 15,96mm (1.5%) y 13,06mm (2.0%) sobre s. mutans[6]. Caqui[9] que determinó el efecto inhibidor del extracto hidroalcohólico del Allium sativum (ajo) a una concentración de 120 mg/ml, dando como resultado un halo de inhibición de 10,5mm sobre s. mutans[9].

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

El extracto hidroalcohólico de Origanum vulgare tiene actividad antibacteriana sobre S. mutans ATCC 25175™. Todas las concentraciones presentaron actividad inhibitoria.

La mayor actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare,* se encuentra en la concentración de 50 mg/ml y es de 42.77mm.

La menor actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare,* se encuentra en la concentración de 1,5625 mg/ml y es de 21.73mm.

6.2. Recomendaciones

Recomendamos seguir investigaciones *in vitro* de este producto natural, *Origanum vulgare,* utilizando diferentes métodos de extracción de principios activos.
Realizar ensayos a nivel celular, in vitro para descartar citotoxidad de la planta de *Origanum vulgare.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARAVÍ, M. Efecto antibacteriano y antifúngico 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 cándida albicans atcc 90028. Lima: Rev. Universidad Privada Norbert Wiener, 2012.

2. Mattos MA, RA. Riesgo de caries dental. Rev. Estomatológica Herediana 2013;14(1-2) :101 – 106

3. Henostroza G. Diagnóstico de caries dental. 2 ed. Lima: UPCH; 2005.

4. HUARI, G. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) en Streptococcus mutans. Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos, 2014.

5. Cosco D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla. [Tesis, para optar al título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.

6. Choca M, (2016). Efectividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de cascara de papaya al 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0% sobre cepas de Streptococcus mutans; estudio in vitro. Universidad Central Del Ecuador. Quito: UCE. p. 50. Disponible en: http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6812

7. Jiménez A, (2015). Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de allium sativum (ajo) blanco, púrpura y clorhexidina al 0,12% sobre cepas de streptococcus mutans. Universidad Central Del Ecuador. Quito: UCE. 76 p. Disponible en: http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5335

8. Alvarado G, (2015). Efecto antibacteriano In vitro del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a Enterococcus faecalis. Universidad Nacional De Trujillo Escuela De Postgrado. Disponible en: http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/259

9. Caqui S, (2016). Efecto Inhibidor del Extracto Hidroalcohólico del Allium Sativum (ajo) a Diferentes Concentraciones en Comparación al Perio-aid® Frente a Cepas de Streptococcus Mutans. Estudio In Vitro. Lima 2016. Universidad Privada Norbert Wiener. Disponible en: http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/41924

10. Cosio H, (2017). Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de albahaca (Ocimum basilicum) sobre el crecimiento de Actinomyces viscosus. Universidad Alas Peruanas. Disponible en: http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/index

11. MARAVÍ I, (2012**)** EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO 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 Cándida albicans ATCC 90028. Universidad Privada Norbert Wiener. Disponible en: http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/48

12. Figueroa Gordon M, Alonso Guillermina, Microorganismos presentes en las diversas etapas de la progresión de caries dental. Acta odontológica venezolana- volumen 47 N°1/2009.

13. Pérez J, Duque de Estrada J, Hidalgo I. Asociación del Estreptococos mutans y lactobacilos con la caries dental en niños. Rev Cubana Estomatol. 2007; 44(4): 0-0.

14. Medina R, Moreno L, Velasco M, Gutiérrez S. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del Streptococcus mutans ATCC 25175 “in vitro”. NOVA. 2013; 3(3): 25-30.

15. Actividad cariogénica y su relación con la incidencia de caries. Revista ADM volumen LV, marzo-abril N° 2 paginas 81-85.

16. Aricapa Barrera Diana Paola, Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Bacteriología Bogotá 2009

17. Las plantas aromáticas, Orégano, Revista de la natura y ambiente, Disponible en: http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/oregano/

18. Arcila C, Loarca G, Lecona S, González E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Alan. 2004; 54(1): 100-111.

19. Bastos M, Damé L, De Souza L, Almeida D, Alves M, Braga J. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de Origanum vulgare L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Rev Cubana Plant Med. 2011; 16(3): 260-266.

20. Huerta. C (2005). Orégano mexicano: oro vegetal. Disponible en: Http://www.maph49.galeon.com/biodiv2/oreganoi.html

21. Rojas J, García A, López A. C, Botta E, Díaz Y. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Universidad de Antioquía. Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. [en línea]. 2005.[citado el 06 de Febrero del 2015]; 4(2), p. 28- 32. Disponible en: http://www.oalib.com/paper/2925326#.VNrXHvmG-So

22. Ramiro L, Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. [en línea]. 2009. [citado el 06 de Febrero del 2015]; 2(42), p. 263- 268. Disponible en: http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/2687/1409

23. Muñoz M, Lara J, (2017). Efecto inhibidor del extracto oleoso del Orégano vulgare sobre el crecimiento in vitro de cepas de Streptococcus mutans. Rev. Universidad Central Del Ecuador. Disponible en : http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9136

24. García G, (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial de origanum vulgare (orégano) en cepas de porphyromonas gingivalis. Estudio in vitro. UCE. p. 74.

Rev. Universidad Central Del Ecuador. Disponible en : http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9490

25. Banderas J, Gonzales M, Sanchez M, Millan E, López A. Flujo y concentracion de proteinas en saliva total humana. Rev. Salud Pública Mex. 1997; 39(5): 433 441.

26. Jaroslav. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catalogo de los géneros, editorial salesiana –lima –Perú, 1991:265-268.

27. Dorland, Diccionario Médico Ilustrado. 26ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2003. caries dental; etiología, placa bacteriana; p. 129, 307, 641.

28. Portal Regional de la Biblioteca Virtual de Salud. Información y Conocimiento para la Salud. Disponible en: http://pesquisa.bvsalud.org/portal/decs-locator/?output=site&lang=es&from=0&sort=&format=summary&count=20&fb=&page=1&q=&index=tw

29. El Diccionario de la lengua española (DRAE) es la obra de referencia de la Academia. La última edición es la 23. ª, publicada en octubre de 2014.

30. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica, Martha Negroni 2° edición, editorial médica panamericana, Buenos Aires 656 paginas.

31. Bloglosario de P. Social Aplicada 2008/09. *Método Experimental*. Disponible en: https://bloglosariopsa.wordpress.com/2008/11/12/metodo-experimental/

32. Gray L. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. En: Murray PR editor Manual of Clinical Microbiology. (6 ed). Washington: ASM Press; 1995. p. 450-456.

33. Clinical and Laboratory Standars Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones anaeróbicas. Norma aprobada— novena edición 2010; (22)2: 1 - 99. M07-A8

34. Microbiología e inmunología evaluación y repaso, Warren Levinson y Ernest Jawetz, editorial el manual moderno México D.F. 1992712 páginas.

35. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología, editorial académica. Sandra Janeth Gutiérrez Prieto 1°edicion editorial pontificia universidad javeriana, 2006 379 paginas

36. Simón G, Estévez A, Bertomeu MT. Fundamentación y normas en Bioética (OMS). Programa Regional de Bioética para américa Latina y el Caribe. OPS/OMS. 2005;(4):30-45.

ANEXOS

Anexo 1: Tabla de recolección de datos de halos de inhibición de crecimiento de S. mutans en 6 concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgar.*

Nº	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*	Halos de inhibición P1	P2	P3
1	50 mg/ml	42 mm	43 mm	43.3 mm
2	25 mg/ml	38.9 mm	38.8 mm	39.2 mm
3	12,5 mg/ml	36.8 mm	35.9 mm	37 mm
4	6,25 mg/ml	33 mm	33 mm	33.7 mm
5	3,125 mg/ml	28.3 mm	27.6 mm	29.8 mm
6	1,5625 mg/ml	20.5 mm	23.5 mm	21.2 mm

Anexo 2: Proceso de obtención del extracto seco *Origanum Vulgare*. Filtración del material macerado, extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare*. Secando en estufa a una temperatura de 50°C hasta sequedad para obtención de 2.5g de extracto seco de *Origanum Vulgare.*

Fig. 1. Proceso de obtención del extracto seco *Origanum Vulgare.*

Fig. 2. 2,5g extracto seco *Origanum Vulgare.*

Anexo 3: Preparación de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico *de Origanum vulgare.*

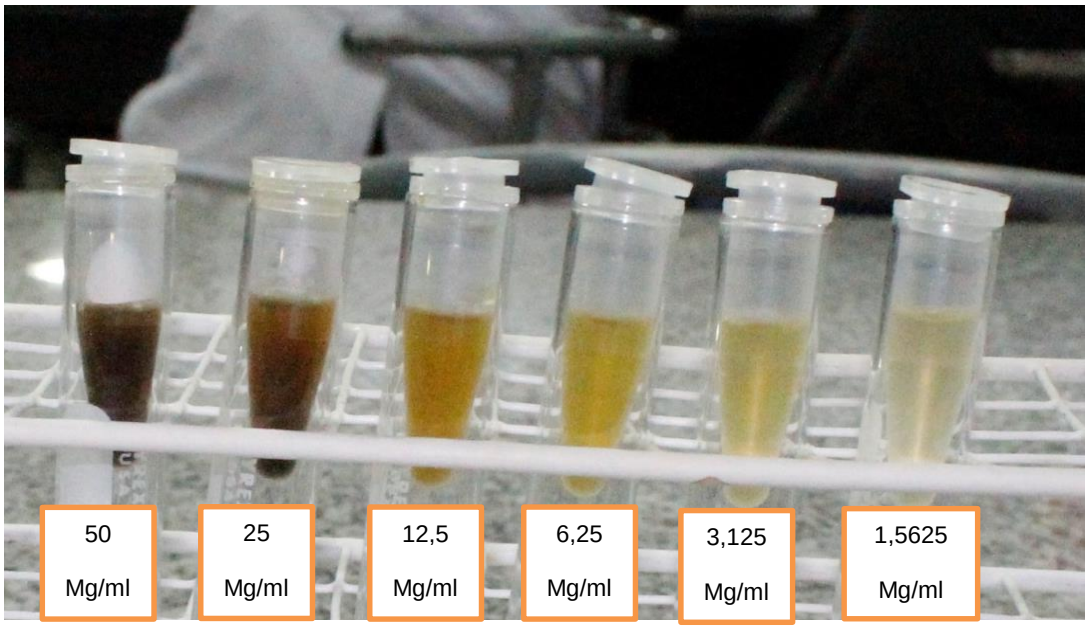


Fig. 1. Diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico *de Origanum vulgare.*

Anexo 4: Preparación y Estandarización del inóculo de Streptococcus mutans ATCC 25175 y Siembra en superficie en placas con agar Müeller Hinton.

Colonias de Streptococcus mutans para suspensión.

Preparación de la suspensión bacteriana en tubos con caldo Müeller Hinton.

Suspensión de S. mutan, estandarizado (1.5 x108 UFC/mL).

Siembra en superficie del inóculo en placas con agar Mueller Hinton.

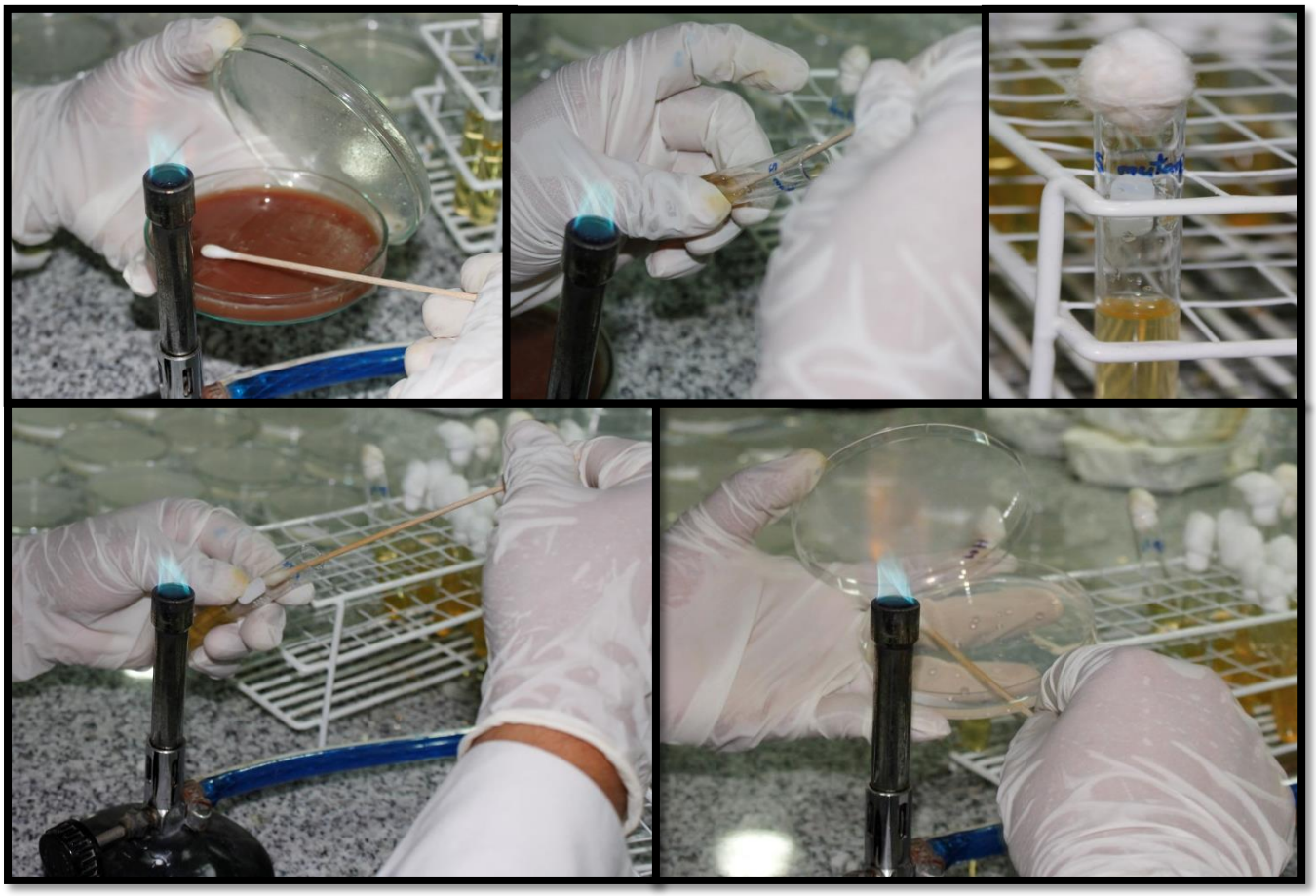


Fig. 1. Preparación y Estandarización del inóculo de Streptococcus mutans ATCC 25175 y Siembra en superficie en placas con agar Müeller Hinton.

Anexo 5: Evaluación por el método de difusión en pozo. Placas inoculadas después de 24 horas de incubación.

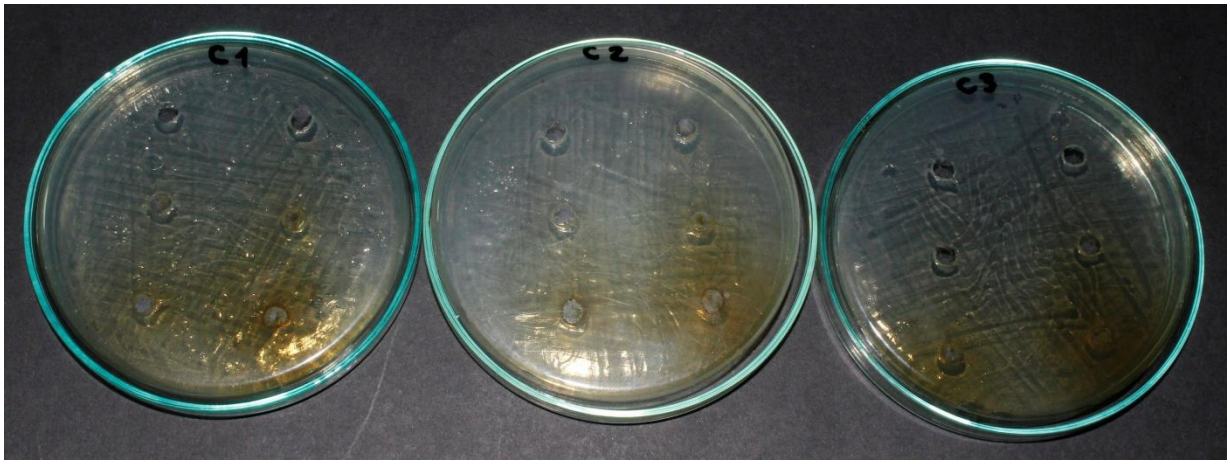


Fig. 1. Actividad antibacteriana del extracto Hidroalcohólico de Origanum vulgare sobre Streptococcus mutans

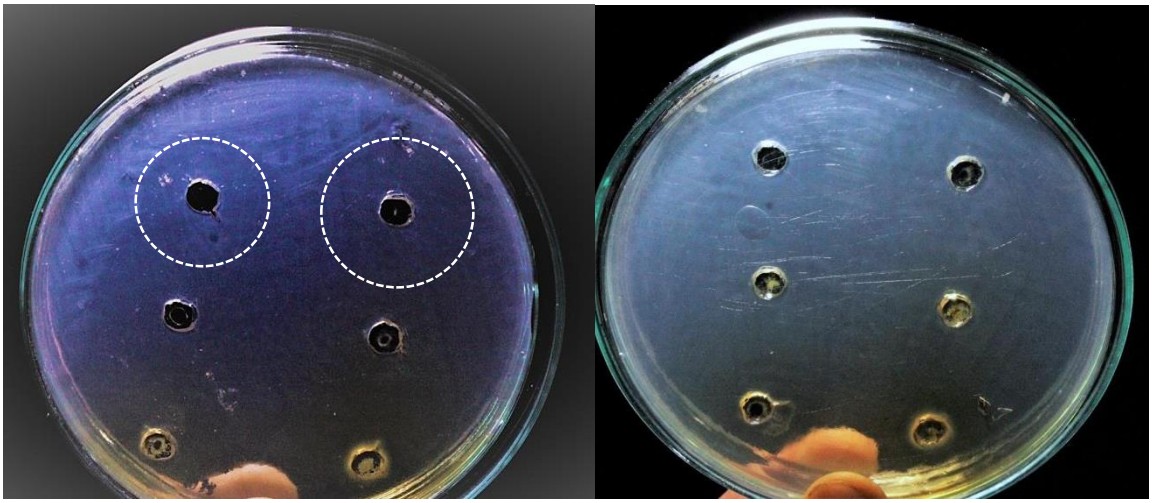


Fig. 2. Zona de inhibición del extracto Hidroalcohólico de Origanum vulgare sobre Streptococcus mutans