

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS DE SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



“EFICACIA ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Propóleo VERSUS EL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* “orégano” SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 TACNA, 2017”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
CIRUJANO DENTISTA

BACH.: JESSICA SÁNCHEZ LOZA

TACNA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios por guiarme espiritualmente, ayudarme a vencer mis obstáculos y permitirme culminar con este proyecto que es tan importante en mi formación profesional.

A mi madre por ser mi amiga y compañera incondicional durante todo este camino, por su constante apoyo, por haberme ayudado durante estos años, el sacrificio fue grande, pero tú siempre me diste la fuerza necesaria para continuar y lograrlo, este triunfo también es tuyo.

A mi Papá Grande Emilio, porque a pesar de no estar presente físicamente te llevo en cada rincón de mi corazón y te dedico con mucho amor este proyecto que te prometí cumplirlo y sí se pudo gracias a tus enseñanzas y buen ejemplo.

A mi Padre por tener siempre la confianza en que lograría salir adelante, aprendí a tener esa fortaleza de las innumerables charlas que me diste de que los retos se podían superar y que lograría graduarme de la universidad, te valoro por tu constante apoyo y tus consejos.

A mi hermano que con sus palabras de aliento y sonrisas me motivaron a seguir lograr mi objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por cuidarme durante todo mi camino y darme todas las fuerzas para poder superar cada prueba.

A mis Padres por ser parte de la culminación de mi carrera, porque a pesar de tantos inconvenientes, salimos adelante juntos y hasta ahora lo seguimos haciendo, todo esto va para ustedes, estoy profundamente agradecida.

A la Escuela Profesional de Odontología por haberme formado durante estos años de mi carrera tanto académica como profesional.

A mis Jurados, Dra. Nelly Kuong, Dr. Dante Pango y al Dr. Jorge Montoya por su apoyo y sus consejos y sus muestras de cariño y conocimiento a lo largo de este proyecto;

A mi Asesora Fiorella Andía porque más que una docente para mí se portó como una verdadera amiga desde que la conocí, gracias.

A mi madrina, por quererme tanto y portarse como mi segunda madre y mostrar su apoyo incondicional a mi madre y a mí cada vez que yo la necesite, y ayudarme en culminar este proyecto tan ansiado para mí, muchísimas gracias.

Al Mblgo.Edwin Obando Velarde por su constante apoyo, paciencia, dedicación y consejos para la culminación de este trabajo.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	7
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	8
1.1. Fundamentación del problema.....	9
1.2. Formulación del problema.....	10
1.3. Objetivos de la investigación	10
1.3.1.Objetivo general.....	10
1.3.2.Objetivos específicos	10
1.4.Justificación.....	11
1.5.Definición de términos	13
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Antecedentes de la investigación	16
2.2. Marco teórico..	21
2.2.1. Caries dental	21
2.2.2. Ecología bucal	28
2.2.2.1. Distribución de los microorganismos en la cavidad bucal	29
2.2.3. Streptococcus mutans	30
2.2.3.1. Género streptococcus.....	30
2.2.3.2. Grupo streptococcus mutans.....	32
2.2.3.3. Características microbiológicas.....	32
2.2.3.4. Medios de cultivo	32
2.2.4. Propóleo.....	33
2.2.4.1. Etimología.....	33
2.2.4.2. Definición	33
2.2.4.3. Características.....	34
2.2.4.4. Composición química	34
2.2.4.5. Propiedades terapéuticas.....	36
2.2.4.6. Efectos adversos	37
2.2.4.7. Uso de propóleo en odontología.....	38
2.2.4.8. Obtención de extracto etanólico de propóleo .	38

2.2.5. Orégano.....	39
2.2.5.1. Etimología.....	39
2.2.5.2. Definición	39
2.2.5.3. Características.....	40
2.2.5.4. Composición química	40
2.2.5.5. Propiedades terapéuticas.....	41
2.2.5.6. Efectos adversos	43
2.2.5.7. Uso del orégano en odontología	43
2.2.5.8. Obtención de aceite esencial de origanum vulgare	44
2.2.6. Gluconato de clorhexidina.....	46
2.2.6.1. Definición	46
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES	49
3.1. Hipótesis.....	50
3.1.1. Hipótesis general	50
3.1.2. Hipótesis específicas.....	50
3.2. Operacionalización de las variables	51
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	52
4.1. Diseño.....	53
4.2. Ámbito de estudio	53
4.3. Población y muestra	54
4.3.1. Criterios de inclusión.....	54
4.3.2. Criterios de exclusión	55
4.4. Instrumentos de recolección de datos.....	55
CAPÍTULO V: PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS	58
5.1. Recoleccion de la muestra.....	59
5.2. Análisis estadístico:.....	72
CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	

RESUMEN

Introducción: La cavidad oral alberga una diversidad de microorganismos, estos son parte importante en la salud y enfermedad oral. El microorganismo principal causante de la caries dental es el *Streptococcus mutans*, como alternativa para disminuir su presencia es preciso buscar nuevas sustancias con propiedades terapéuticas y preventivas. Con el objetivo de eliminar la acción cariogénica de esta bacteria, se plantea la investigación de medicamentos naturales. El Perú es un país donde existe una biodiversidad de flora y recursos naturales como el propóleo y el orégano. **Objetivos:** Evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo versus el aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Material y Método:** Se utilizó para este proyecto un instrumento de recolección de uso exclusivo del investigador, que corresponde al resultado de la observación de la variable eficacia antibacteriana. **Resultados:** Se demostró la eficacia de los agentes antibacterianos frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, donde el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) logro el mayor crecimiento del halo 26,796 mm, por cada unidad de aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) el crecimiento del halo aumenta en 2,1578 mm. **Conclusión:** Se logró determinar la eficacia antibacteriana en los grupos obteniéndose valores favorables, con una diferencia significativa a la aplicación del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano).

Palabras Claves:

Extracto etanólico de Propóleo

Aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano)

Streptococcus mutans ATCC 25175

INTRODUCCIÓN

Sigue siendo un problema de salud pública en nuestro país el desarrollo de la caries dental, y la promoción en salud bucal según cifras actuales del ministerio de salud 80 de cada 100 peruanos presentan esta enfermedad multifactorial.

La cavidad oral alberga una diversidad de microorganismos, estos son parte importante en la salud y enfermedad oral. El microorganismo principal causante de la caries dental es el *Streptococcus mutans*, como alternativa para disminuir su presencia es preciso buscar nuevas sustancias con propiedades terapéuticas y preventivas. Con el objetivo de eliminar la acción cariogénica de esta bacteria, se plantea la investigación de medicamentos naturales. El Perú es un país donde existe una biodiversidad de flora y recursos naturales como el propóleo y el orégano.

El Propóleo es una sustancia compleja constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia. Además, una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antibacteriana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides.

En el *Origanum vulgare* pueden encontrarse estos mismos compuestos. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento. Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos. El *Origanum vulgare* le debe su actividad antimicrobiana al timol.

Es por esta razón que el presente trabajo de investigación pretende evaluar la eficacia antibacteriana de estos recursos naturales: Propóleo y *Origanum vulgare* (orégano) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

CAPÍTULO I:
EL PROBLEMA DE
INVESTIGACIÓN

1.1. FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA

La caries dental es una enfermedad que predomina en niños y adultos jóvenes, pero puede afectar a cualquier persona. Además, es la causa más frecuente de pérdida de los dientes en las personas más jóvenes. Ya que es un problema recurrente en el Perú, según el Ministerio de Salud, 98 de cada 100 peruanos presenta lesiones cariosas, cifras que generan preocupación sobre la salud bucal de los peruanos¹.

Asimismo, esta enfermedad es producto de diversos factores que implica la interacción de los dientes, la saliva y los microorganismos como factores individuales y la dieta como factor externo².

Por lo general, cuando se produce la acumulación de microorganismos específicos sobre la superficie del esmalte, se elaboran productos ácidos que desmineralizan la superficie y destruyen el diente. Los principales microorganismos relacionados con la caries son los *Streptococcus* con las subespecies *S.mutans* y *S.sobrinus*. Además de *Lactobacillus* y *Actinomyces*³. De todos ellos, el *Streptococcus mutans* es el principal microorganismo causal que se vincula frecuentemente con el inicio de lesiones cariosas⁴.

Ante esta problemática, diversas investigaciones han explorado las propiedades antibacterianas de algunos productos, de procedencia natural, contra uno de los principales agentes responsables de la caries dental, es decir, el *Streptococcus mutans*.

En tal sentido, estos trabajos científicos han evidenciado que el extracto etanólico de Propóleo y el aceite esencial de orégano presentan gran potencial antibacteriano contra el *Streptococcus mutans*, así también como otras propiedades relacionadas con la reducción de sensibilidad, inhibición de la placa bacteriana, capacidad antiinflamatoria y otros^{1,4}.

1.2.FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propóleo versus el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.3.OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propóleo versus el aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Conocer la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- ✓ Conocer la eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- ✓ Conocer la eficacia antibacteriana in vitro del gluconato de clorhexina sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 como grupo control.
- ✓ Comparar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propóleo y el aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al grupo control de la clorhexidina.

1.4.JUSTIFICACIÓN

Ante la necesidad de prevenir y controlar la caries dental se ha adoptado métodos o tratamientos para precaver el avance, el dolor y la pérdida dental de los pacientes.

Por ello, el presente trabajo es conveniente ante esta problemática, ya que se investiga fuentes naturales que contrarresten la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* ATCC 25175, en este caso el extracto etanólico de Propóleo⁴ y el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) a diferentes concentraciones³.

De esta manera, la información obtenida sobre la efectividad del extracto etanólico de Propóleo y el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) contribuiría en el repertorio de tratamientos odontológicos contra la caries.

Asimismo, se visualiza gran relevancia social en el presente trabajo porque se sabe que la mayor población afectada por la caries está formada por niños y jóvenes, en su mayoría; sin embargo, en general se ve afectada la salud bucal de toda persona en cualquier etapa de su vida. Esto es un gran problema porque la salud bucal es la base de la salud, considerando que la boca interviene en la ingesta de nutrientes y en el contagio de enfermedades.

Por ello, el efecto antibacteriano de las sustancias estudiadas contribuirá en la salud bucodental, y por ende se garantizará una buena salud y una buena calidad de vida, entendida como la ausencia de enfermedades bucales y limitaciones en la capacidad de morder, masticar, sonreír y hablar, al tiempo que repercutirán en el bienestar psicosocial de la persona.

Además, la implicancia práctica de la investigación es bastante próxima, ya que el efecto antibacteriano de las sustancias estudiadas contra la caries es inmediato. También viene a ser una alternativa favorable en el tratamiento de la caries dental porque al ser elementos naturales son accesibles en cualquier punto de venta y al tener efecto antibacteriano ostentan efectividad en la eliminación los agentes causantes de esta enfermedad. Esto podría tener implicancias a futuro en las alternativas de tratamiento de enfermedades bucodentales, debido a que algunas sustancias procesadas o no naturales manifiestan efectos secundarios, lo cual ocasiona mayor demanda de sustancias naturales en las intervenciones odontológicas, como medida de cuidado y prevención de la salud.

Por último, se pretende lograr un aporte significativo en la especialidad de odontología, en el aspecto teórico. Con la ayuda de la información obtenida se facilitará la realización de diversas investigaciones que contrasten la efectividad de las sustancias estudiadas y las comparen con nuevas alternativas de tratamiento, lo cual impulsará la exploración de otras áreas científicas, en este caso, la fitoterapia y la apiterapia aplicadas a la odontología, con la finalidad de estudiar las plantas que poseen efecto medicinal.

1.5.DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

1.5.1. *Streptococcus mutans*: es un microorganismo que forma parte del género *Streptococcus*, y se encuentra dentro del grupo denominado *Streptococcus viridans*. Morfológicamente son cocos gran positivos, a veces forman cadenas, no esporulados e inmóviles. Asimismo, es acidófilo porque vive en medio de pH bajo, es acidogénico porque metaboliza los azúcares a ácidos, es aciduro porque sintetiza ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones y es anaerobio facultativo ya que presenta un metabolismo fermentativo. Se desarrolla en temperaturas 36-37 °C. Por último, está vinculado con la formación de caries dental, por su capacidad de fermentar la sacarosa⁶.

1.5.2. Extracto etanólico de Propóleo: es obtenido a partir de materia prima desecada, en este caso el propóleo, por maceración en contacto con el solvente etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. En suma, el Propóleo es una sustancia resinosa, gomosa, dura y quebradiza, procedente de las cortezas y las yemas de los árboles o arbustos y es recogida por las abejas.

1.5.3. Aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano): es un producto de composición generalmente muy compleja que contiene los principios volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, en este caso el *Origanum vulgare*, también conocido como orégano, identificado como planta aromática perenne ramificada de la familia de las lamiaceae con hojas verde oscuro, ovaladas, pecioladas y con vellosidades que puede alcanzar 1 metro de altura⁷.

1.5.4. Eficacia antibacteriana: es la capacidad de ciertas sustancias de inhibir el crecimiento o desarrollo de bacterias en un tiempo y lugar determinado. En otras palabras, pueden evitar la reproducción bacteriana, pero no necesariamente producir la muerte de ellas. Por lo tanto, la capacidad de un agente antibacteriano para inhibir o producir la lisis de los microorganismos patógenos depende de la concentración y temperatura. Por último, la medición de la eficacia antibacteriana teniendo en cuenta las unidades formadoras de colonias y la medida de halos de inhibición¹.

**CAPÍTULO II:
REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Según la revisión bibliográfica, anteriormente se han realizado estudios nacionales sobre la actividad antibacteriana del *Origanum vulgare*. Entre ellos, se encuentra la investigación realizada por **Pimentel, Castillo, Quintana, Maurtua, Villegas y Díaz**⁷ “Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal”, en Perú en el año 2015, tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (orégano), *Tagetes elliptica* (chincho) y del *Tagetes minuta* (huacatay) comparado con clorhexidina al 0.12% y Colgate Plax frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. El diseño del estudio fue de tipo experimental in vitro de corte transversal. Tuvo como tamaño muestral 7 placas agar que contenían las cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121, y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Se utilizó el método de Difusión en Agar, Mínima Concentración Inhibitoria y Técnica PourPlate (Técnica de Vertido en Placa). Según los resultados se determinó que existe actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (orégano), comparado con clorhexidina al 0,12% y Colgate Plax frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4312 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

En el mismo sentido, se ha encontrado investigaciones respecto a la actividad antibacteriana del propóleo. Primero, **Eguizába y Moromi**¹ en “Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*” en Perú en el año 2007, realizaron un trabajo con el objetivo de determinar la acción antibacteriana el extracto etanólico del Propóleo peruano proveniente del Valle de Oxapampa (Pasco). Fue una investigación experimental in vitro, desarrollada mediante el método de difusión en Placa se usó las cepas *Streptococcus mutans* ATCC

25175 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 en un grupo experimental y control conformado por 20 discos de papel de Whatman y 3 para la muestra definitiva, para así enfrentarlas a las soluciones: 0,8, 20 y 30 % v/v del EEPP, y compararlas a los testigos clorhexidina 0,12 % y alcohol 70 %. Se determinó que la acción antibacteriana del extracto etanólico del propóleo peruano contra *S. mutans* muestra una mayor tendencia de actividad inversamente proporcional a su concentración y también la acción antibacteriana del EEPP al 0,8 % es mayor que la acción de la clorhexidina. Por lo tanto, se concluyó que el extracto etanólico del propóleo peruano en solución al 0,8 % tiene una mejor acción antibacteriana contra *S. mutans* que la clorhexidina al 0,12 %.

Asimismo, **Vaculik, Roque, Cardozo, Pérez, Ramírez** ⁸ en la investigación “Acción antimicrobiana de extracto etanólico de Propóleo sobre *Streptococcus mutans*”, en Perú en el año 2014, tuvieron el objetivo de conocer los efectos antimicrobianos del propóleo sobre los *Streptococcus mutans*. Para ello, la realización de la solución de propóleos se realizó según las normas IRAM INTA 2008, se utilizaron 10 placas de agar Mitis Salivarius para cada una de las concentraciones, correspondientes a cada una de las diluciones (10,5 y 2.5%) y se midió el halo de inhibición, determinándose la CIM (concentración inhibitoria mínima) según la concentración de esta manera, concluyeron que el propóleo es significativamente inhibitorio a concentraciones del 10% sobre *Streptococcus mutans*.

También **Ayala, Castillo y Mejía** ⁹ en “Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana”, en Perú en el año 2016, pretendieron su actividad antibacteriana in vitro en cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Para ello desarrollaron un enjuague bucal con la concentración mínima bactericida de propóleo fue de 1,5ug/mL y como material biológico 10 placas de *S. mutans* ATCC 35668. Los resultados obtenidos determinaron que el enjuague bucal a base de propóleo puro tiene mayor promedio de halo de inhibición en relación a las diluciones 1:2, y 1:4

con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El enjuague bucal elaborado a base de propóleo peruano, tiene calidad farmacéutica y efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

En el ámbito internacional, se ha realizado trabajos con la finalidad de estudiar los usos del propóleo en la odontología. **Navarro, Lezcano, Mandri, Giliy y Zamudio**¹⁰ “Utilización del propóleo en odontología”, en Quito en el año 2016, pretendieron conocer las propiedades del propóleo en la salud bucodental y en el tratamiento de la caries dental. Concluyendo que el propóleo presenta efectos antimicrobiano, antiinflamatorio y anticariogénico; lo cual se sustenta en evidencias contundentes que confirman al propóleos como fuente de incremento de la salud bucal basado en sus principios biológicos.

En el mismo sentido, **Moreno, Martínez y Figueroa**¹¹ en “Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, en Quito en el año 2007, evaluaron la actividad antimicrobiana de cuatro extractos de propóleos argentinos, cinco colombianos y uno cubano frente a *Streptococcus mutans*. Tuvo un diseño experimental in vitro, en la cual se tomaron cuatro muestras de propóleo argentino, cinco colombianos y uno cubano, que habían sido obtenidos por extracción con alcohol etílico al 96%. Asimismo, la actividad bactericida y bacteriostática fue medida por concentración mínima inhibitoria en un rango entre 0.02 y 15 mg/ml. Los propóleos que presentaron mayor efecto bactericida fueron el 2 y el 3 (muestras colombianas) luego de 48 horas de incubación. El mejor efecto bacteriostático lo presentó la muestra 2 (propóleo colombiano) a un periodo de incubación de 24 horas. Por lo tanto, el 70% de las muestras de propóleo incrementaron su actividad luego de un tiempo de incubación de 48 horas, en relación con el efecto detectado a las 24 horas.

Asimismo, **Rueda**¹² en “Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra

Streptococcus mutans en Quito en el año 2015, realizó un estudio con el propósito de comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de propóleo Ecuatoriano con el gluconato de clorhexidina. El estudio fue experimental in vitro, de tipo transversal y comparativo. Se evaluó 20 unidades experimentales del estudio, para evitar errores en la experimentación se realizaron 30 unidades experimentales, evaluado a partir de una cepa de patrón liofilizado de “*Streptococcus mutans*”. Las variables fueron sometidas a experimentación en condiciones controladas, se utilizó una cepa de “*Streptococcus mutans*”; ATCC 25175; que se sembró en placas petri con agar sangre; sobre la cual se colocó discos de papel filtro impregnados con extracto acuoso de Propóleo Ecuatoriano al 30%, extracto Acuoso de Propóleo Ecuatoriano al 50% y gluconato de clorhexidina al 2%. Los resultados fueron procesados con el SPSS 22 y Stragafics 6,0 programas estadísticos, junto con la tabla de análisis ANOVA. Se realizó la lectura de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco trascurridas las 48 horas, en el cual se evidencio mayor inhibición para el gluconato de clorhexidina que para los extractos acuosos de propóleo ecuatoriano al 30% y al 50%; no descartando así el efecto antibacteriano de los extractos acuoso de propóleo.

Por otro lado, estudios revelan que el *Origanum vulgare* presenta afectos relevantes en la actividad antibacteriana. Por ejemplo, **Escobar y Torres** ^{13,14}en “Evaluación de la eficacia antibacteriana in vitro de un colutorio de aceite esencial de *Origanum vulgare l. (orégano)* sobre *Streptococcus mutans*”, El Salvador en el año 2016, pretendieron evaluar la eficacia antibacteriana in vitro de dos formulaciones de un colutorio de aceite esencial de orégano sobre *Streptococcus mutans*. El presente trabajo es de carácter experimental y prospectivo experimental. Asimismo, se llevó a cabo empleando como muestra dos colutorios de aceite esencial de *Origanum vulgare*, ambos se formularon con los mismos excipientes, cambiando la concentración del aceite esencial de orégano, uno de 0.05% y otro de 0.10%, dichas concentraciones fueron elegidas después de hacer ensayos de tolerancia

del sabor del aceite esencial de orégano. Además, se inoculó 10 placas de Agar Müller Hinton (AMH) enriquecido con 5% de sangre desfibrinada de carnero con un cultivo puro procedente de liofilizado de *S. mutans* ATCC 25175. 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.

Lara¹⁵ en “Efecto inhibitor del extracto oleoso del *Origanum vulgare* sobre el crecimiento in vitro de cepas de *Streptococcus mutans*”, en Quito en el año 2017, realizó la investigación para determinar el efecto inhibitor del extracto oleoso del Orégano vulgare sobre el crecimiento in vitro de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tuvo un diseño experimental in vitro y la muestra fue constituida por 8 cajas petri con cultivos bacterianos de *Streptococcus mutans*. Asimismo, se utilizó el método de difusión en agar con disco de (Kirby – Bauer) y se obtuvo el aceite esencial de *Origanum vulgare* por el método de arrastre por vapor de agua. Para realizar el análisis microbiológico, se utilizó el aceite esencial del orégano al 50 y 100%. Este aceite esencial, fue comparado con Gluconato de Clorhexidina al 0.12% como grupo de control positivo y como control negativo se utilizó agua destilada. Los resultados obtenidos señalaron que el aceite esencial de *Origanum vulgare* a la concentración del 100% tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans*, que a la concentración del 50%. Asimismo, el aceite esencial de *Origanum vulgare* a sus dos concentraciones al 50 y 100% tienen mayor efectividad antibacteriana que el control positivo: Clorhexidina al 0.12%.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. CARIES DENTAL

2.2.1.1. DEFINICIÓN

La caries dental definida como una enfermedad que presenta múltiples factores causales, universal, que se caracteriza por la disolución química localizada, de los tejidos duros del diente por la acción de los ácidos orgánicos, resultantes del metabolismo bacteriano de azúcares³. Es multifactorial porque involucra diversos factores como dieta, microorganismos, tiempo y huésped cuya interacción es indispensable para vencer los mecanismos de defensa del esmalte produciendo de esta forma la enfermedad ¹.

Asimismo, es identificada como la destrucción localizada del tejido dental duro susceptible de ser atacado por subproductos ácidos procedentes de la fermentación bacteriana de los hidratos de carbono alimenticios ³. Esto sucede debido a que cuando un órgano dentario se encuentra sometido a los ataques ácidos producidos por la fermentación de los carbohidratos, especialmente la sacarosa se da una pérdida importante de minerales como calcio, fosfatos y carbonatos los cuales son constituyentes importantes de la hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, que es la estructura química más abundante de la porción inorgánica del diente, la cual sufre una desmineralización, también se produce una destrucción de las sustancias orgánicas, resultado del cambio en la ecología así como la actividad metabólica de los microorganismos que han estado en contacto previamente con la superficie del diente como placa bacteriana ¹.

Además, esta enfermedad evoluciona de forma progresiva e irreversible, encontrándose mayormente en zonas susceptibles a mayor cantidad de acumulación de placa bacteriana como son fosas, fisuras restauración mal adaptadas, espacios interdentes, así como pacientes portadores de prótesis dentales por lo tanto inicia en la superficie del diente y avanza hasta su profundidad, su inicio se desarrolla mucho antes del momento en que se hace clínicamente visible ¹⁵. En caso de dejar que siga su curso, la enfermedad llevará consigo cambios perceptibles en la estructura del diente, o lesión de caries, que en un principio no producen una cavidad (tejido intacto desde el punto de vista macroscópico), pero sí podrán hacerlo en el futuro³.

2.2.1.2. ETIOLOGÍA

A través de estudios actualizados se ha pretendido investigar la etiología exacta de la caries dental, donde se evidencia que la etiología de la caries depende principalmente de tres de factores: primero el huésped, que incluye higiene bucal, la saliva y los dientes, seguido a ello la microflora (infecciones bacterianas) y, por último, el sustrato, que implica la dieta cariogénica¹⁷. Adicionalmente, se debe tener en cuenta, el tiempo. En tal sentido, es necesario que las condiciones de los cuatro factores sean favorables para que se forme una caries¹⁷. De esta manera se plantea los siguientes factores etiológicos:

a. Factores relacionados con el huésped

a.1. Saliva

La saliva es una solución super saturada en calcio y fosfato que contiene flúor, proteínas, enzimas, agentes buffer, inmunoglobulinas y glicoproteínas, entre otros elementos de gran importancia para evitar la formación de las caries.

Es conocido también que las macromoléculas salivales están comprometidas con la función de formación de la película salival. bacteriana, entre otras.

a.2. Higiene bucal

La presencia de bacterias (como el *S. Mutans*) es un factor necesario para el inicio y desarrollo de la caries dental, por lo que la acumulación de placa en ausencia de cualquier método de higiene oral, da lugar en un periodo de tres a cuatro semanas a la aparición de la "mancha blanca" o lesión clínica inicial de desmineralización del esmalte. La eliminación mecánica de la placa productora de ácido modifica las condiciones ambientales favorables a la desmineralización e interrumpe la progresión de la lesión inicial.

b. Microflora

Del gran número de bacterias que se encuentra en la cavidad bucal, los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus* (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*), así como la *Rothia dentocariosa*, han sido asociados

con la caries tanto en animales de experimentación como en humanos.

Para comprender la acción de las bacterias en la génesis de la caries dental, es necesario estudiar los mecanismos por los cuales estos microorganismos colonizan el diente y son capaces producir daño (virulencia).

b.1. Colonización bacteriana

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son absorbidas por el esmalte dental.

Para la colonización bacteriana, es imprescindible la formación previa de una fina película de proteínas salivales sobre la superficie del diente: la ya mencionada película adquirida.

La interacción se produce en cierta medida a través de cargas electrostáticas. La carga eléctrica de las proteínas se relaciona con la presencia de grupos ionizables en sus aminoácidos constituyentes.¹

Estudios recientes indican que la unión de las bacterias a la película adquirida y entre sí, no puede ser explicada solamente por uniones electrostáticas, sino que se ha evidenciado la acción de moléculas de naturaleza proteica en la superficie de las bacterias, denominadas adhesinas, que se unen a las proteínas salivales

las cuales actúan como receptores y facilitan la adherencia bacteriana. Esto es posible por el fenómeno de reconocimiento molecular. Se ha observado que mientras mayor es la capacidad de adherencia del microorganismo, mayor es la experiencia de caries dental.

b.2. Factores de virulencia

En el caso del *Streptococcus mutans*, los factores de virulencia más involucrados en la producción de caries son:

1. Acidogenicidad: el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
2. Aciduricidad: Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
3. Acidofilicidad: El *Streptococcus mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.
4. Síntesis de glucanos y fructanos: por medio de enzimas como glucosil y fructosil transferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la bacteria a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes. Las glucosiltransferasas catalizan la hidrólisis de dos moléculas de sacarosa en sus monosacáridos constituyentes: la alfa-D-glucosa y la beta-D-

fructuosa. Las moléculas de glucosa resultantes, son polimerizadas por enlaces alfa (1-6), alfa (1-4) o alfa (1-3) y forman los glucanos extracelulares bacterianos y se liberan dos moléculas de fructuosa.

De acuerdo con las características de solubilidad de su producto, las glucosiltransferasas se clasifican en: GTF-S, las que sintetizan el dextrano, un glucano que posee predominantemente uniones lineales alfa (1-6), es soluble en agua y de aspecto globular, GTF-I, sintetiza un glucano insoluble y fibrilar con predominio de uniones alfa (1-3) y la GTF-SI, sintetiza ambos tipos de glucanos.

El *Streptococcus mutans* secreta los tres tipos de glucosiltransferasas. Al producto de la GTF-I y la GTF-SI, con predominio alfa (1-3), se le denomina mutano. Su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar, lo involucra en los fenómenos de adherencia, agregación y acumulación bacteriana en la placa dental.

De esta manera la capacidad de producir mutano, está involucrada en el poder cariogénico del *Streptococcus mutans*.

5. Producción de dextranasa: Las bacterias tienen la posibilidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como la dextranasa y la mutanasa. Estas se disponen en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, lo hidrolizan y facilitan así el paso de

los productos de la hidrólisis hacia el interior de la misma.

Por tanto, los glucanos extracelulares pueden ser utilizados por las bacterias como fuente de energía. Además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.

c. Sustrato cariogénico

Dentro de los factores que favorecen el desarrollo de la caries dental, uno de los más estudiados es el consumo excesivo de azúcares simples. Numerosos estudios han demostrado la asociación entre caries y carbohidratos refinados o azúcares, especialmente, la sacarosa o azúcar común. Los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microflora bucal y dan inicio al proceso de cariogénesis.

La sacarosa, formada por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; se considera el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque el *Streptococcus mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa.

d. Factores de tiempo en el desarrollo de la caries

La caries se considera una enfermedad crónica debido a que las lesiones se desarrollan durante un largo periodo. El tiempo transcurrido promedio entre el momento en que aparece la caries

incipiente y la caries clínica es entre 18 y 6 meses. La probabilidad anual de aparición de caries alcanza un pico, entre dos y cuatro años después de la aparición del diente y declina después de este tiempo, reflejando posiblemente una “maduración” posteruptiva de la superficie del esmalte.

2.2.2. ECOLOGÍA BUCAL

La ecología comprende el estudio de las relaciones entre los microorganismos y el ambiente. La cavidad bucal es considerada un ambiente, por lo que las propiedades de este ambiente influyen en la composición y la actividad de los microorganismos que se encuentran en él¹⁷.

La salud y la enfermedad de la cavidad bucal son determinadas por diversos factores, los que más destacan son los siguientes¹⁸:

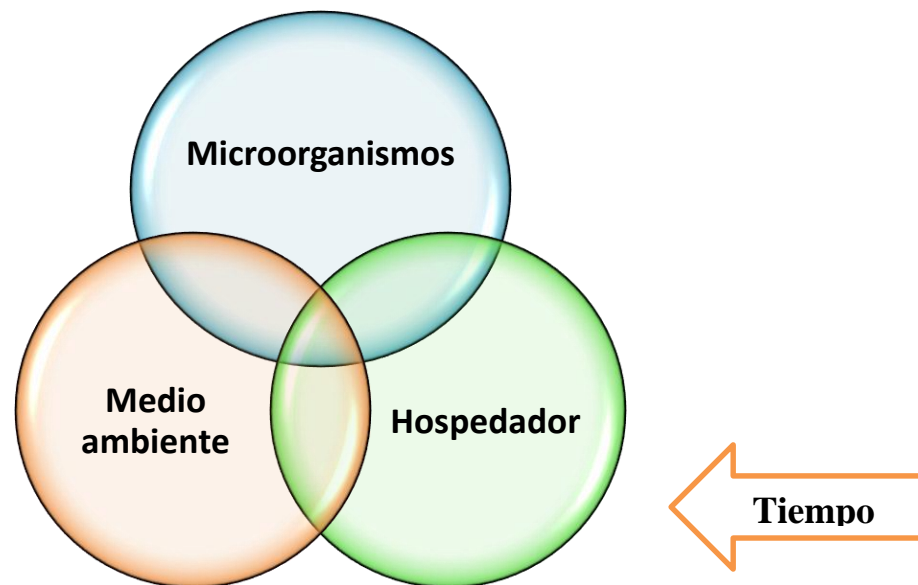


Figura 1. Esquema de factores influyentes en la ecología de la cavidad bucal

Asimismo, la microbiota de la cavidad bucal es compleja y comprende más de 300 especies, que incluye microorganismos endógenos y

exógenos capaces de colonizar y en algunos casos comportarse como oportunistas si el medio bucal lo permite.

Existen algunos factores que promueven el desarrollo microbiano, los cuales son la temperatura, la humedad, el potencial rédox, el pH bajo y los nutrientes (exógenos y endógenos). De igual manera, los factores que limitan el desarrollo microbiano son la disponibilidad limitada de nutrientes, los factores antimicrobianos salivales, el pH alto, la exfoliación de células epiteliales y la deglución¹⁸.

2.2.2.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA CAVIDAD BUCAL

Básicamente la cavidad bucal tiene dos tipos específicos de superficies donde los microorganismos pueden colonizar: los dientes y los tejidos blandos

- 1) Labios: Es la zona de transición entre la microbiota de la piel y de la boca; los microorganismos característicos de la piel son *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp* y bacilos gramnegativos.
- 2) Mucosa yugal: Predominan los *Streptococcus mitior*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius*.
- 3) Paladar: *Streptococcus sp*, *Lactobacillus sp* y *Haemophilus sp*. La deficiencia de la higiene oral favorece el desarrollo de un hongo levaduriforme llamado *Candida albicans* que produce diversas patologías. Recientemente se han aislado especies de *Klebsiella sp* de estas lesiones.
- 4) Lengua: *Streptococcus salivarius*, *S. mitior* y un bajo número de *S. milleri* y *S. sanguis*. También se han aislado especies de *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* y espiroquetas. Un

microorganismo llamado *Stomatococcus mucilaginosus*, también ha sido aislado en la lengua y en la nasofaringe y se ha comprobado que produce un polisacárido que aumenta su virulencia.

- 5) Saliva: Esta no posee una microbiota propia.
- 6) Surco gingival: En el estado de salud se detectan grampositivos aerobios y anaerobios facultativos *S. sanguis*, *S. mitior*, enterococos y bacilos filamentosos. En el estado de enfermedad aparecen anaerobios gram negativos: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonellas* y treponemas.

2.2.3. *Streptococcus mutans*

2.2.3.1. GÉNERO STREPTOCOCCUS

Etimológicamente “Streptus” significa flexible y “coccus” significa grano o baya¹⁹. Los géneros *Streptococcus* están formados por bacterias esféricas u ovoides que crecen en pares o cadenas de longitud variable. La mayoría se caracteriza por ser anaerobios facultativos, existiendo algunas especies anaerobios obligados. Además, son Gram positivos, no formadores de esporos, catalasa negativa e inmóvil, y tienen complejos y variables requerimientos nutricionales²⁰.

Bratos (2011) señala que el género *Streptococcus* presenta una clasificación compleja para ellos toma en cuenta los siguientes criterios²¹:

- Según las propiedades serológicas (Lancefield)
 - Iniciales: grupos A a W
 - Actuales: A, B, C, F, G

- Según los patrones hemolíticos: α , β , γ
- Según las propiedades bioquímicas

Mientras que Montes y García señalan que según la secuencia del gen 16SrRNA, los estreptococos se clasifican en 5 grupos¹⁹:

- Grupo piogénico: formado principalmente por especies beta hemolíticas, de colonias grandes, y que incluye especies que son patógenos importantes para el ser humano.
- Grupo mitis: incluye al patógeno neumococo (*S. pneumoniae*) y a otros estreptococos habituales de la cavidad oral, que producen alfa hemólisis en agar sangre.
- Grupo anginosus o milleri: formado por especies que se encuentran en la cavidad oral humana, en el tracto genital y gastrointestinal, con colonias de tamaño pequeño y característico olor a caramelo.
- Grupo salivarius: incluye 3 especies de estreptococos genotípicamente relacionados, que normalmente se encuentran en la cavidad oral humana: *S. vestibularis*, *S. salivarius* y *S. thermophilus*. El último de ellos se relaciona con productos lácteos. Todos los miembros del grupo son Voges-Proskauer positivos y no fermentan la arginina, el manitol ni el sorbitol.
- Grupo bovis: formado por especies que principalmente habitan en el canal intestinal de los animales y que, en ocasiones, infectan a humanos. Pertenecen al grupo D de Lancefield.

2.2.3.2. GRUPO *Streptococcus mutans*

El *Streptococcus mutans* es un habitante de la microbiota oral que constituye la primera causa de caries dental¹ y de infecciones graves por estreptococos del grupo viridans²¹.

El grupo *Streptococcus mutans* ha sido identificado como constituyente de la flora bacteriana oral, por lo tanto, es uno de los agentes responsables de las caries del esmalte dental. Asimismo, es acidófilo porque vive en medio de pH bajo, es acidogénico porque metaboliza los azúcares a ácidos y es aciduro porque sintetiza ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones²².

2.2.3.3. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

En cuanto a las características que presentan microbiológicamente, las describió como cocos Gram positivos que se asocian en parejas y cadenas que pueden ser largas o cortas, además son anaerobios facultativos. Asimismo, cuando se desarrollan en presencia del aire, su crecimiento se ve favorecido por una atmósfera que contenga de 5-10 % de CO₂²³.

2.2.3.4. MEDIOS DE CULTIVO

Tomando en cuenta que son anaerobios facultativos, la temperatura óptima de desarrollo es de 36 ± 1°C, una práctica aconsejable es incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y posteriormente 24 horas en aerobiosis lo que favorece la formación de agua oxigenada que es un importante carácter diferencial por la síntesis de polisacáridos

extracelulares que facilita el reconocimiento de las colonias¹³. Asimismo, el medio de cultivo Infusión de Cerebro Corazón (BHI), es el más empleado y eficaz para el cultivo de bacterias exigentes como *Streptococcus*, *Neumococos*, *Meningococos* y otros ²⁴.

2.2.4. PROPÓLEO

2.2.4.1. ETIMOLOGÍA

El significado de la palabra propóleo; deriva del griego “Pro” que significa defensa de; y “polis” que significa panal ¹².

2.2.4.2. DEFINICIÓN

Según la revisión bibliográfica se han identificado las siguientes definiciones para el término propóleo:

El propóleo es una sustancia resinosa, balsámica, de color verde pardo, castaño o incluso casi negro (dependiendo de su origen botánico), sabor acre, frecuentemente amargo, y olor agradable y dulce, de forma que, cuando se quema, exhala una fragancia de resinas aromáticas²⁵.

El Propóleo es una sustancia resinosa, gomosa, dura y quebradiza. Se caracteriza por tener un olor dulce. Es importante señalar que esta sustancia es generada en las cortezas y las yemas de los árboles o arbustos y es recogida por las abejas. Éstas lo modifican con sus ceras y secreciones salivares y utilizan el propóleo para rellenar agujeros y así ir armando su colmena, digamos que sería el cemento que nosotros usamos para nuestras casas ²⁶.

2.2.4.3. CARACTERÍSTICAS

Eguizába¹ indicó las características que constituyen las propiedades primarias de esta sustancia:

- **Aspecto:** Esferas, granos, briquetas. Existe una estrecha relación con el método de cosecha empleado.
- **Estructura:** Espesa, no homogénea, presencia de impurezas mecánicas y de cera, el cual depende del método de cosecha, pero no debe ser excesivo.
- **Color:** Verde oscuro, amarillo, amarillo-verdoso, pardo, pardo rojizo, pardo oscuro, hasta negro.
- **Consistencia:** Se ablanda y se vuelve pegajosa recién cuando recibe más de 15°C, a temperaturas entre 60 a 70 °C se vuelve líquida.
- **Olor:** Resinoso, aromático, denota la presencia de aceites esenciales y miel en el producto. Pero también existen propóleos inodoros.
- **Sabor:** Generalmente amargo, picante e insípido en raras ocasiones.

2.2.4.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Referente a su composición, esta es variable según su origen botánico, pero básicamente está constituido por²⁵:

- Resinas y bálsamos, 50-60 %.
- Ceras, 30-40 %.

- Aceites esenciales y aromáticos, 7-10 %.
- Polen, 5 %.
- Compuestos flavonoides.
- Crisína (da el color característico a la cera y al propóleos).
- Ácidos fenólicos: ácido benzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico y ácido cumárico, entre otros
- Cumarina.
- Sustancias minerales y microelementos: Pb, Ni, Ag, Fe, Zn
- Vitaminas: provitamina A y algunas vitaminas del grupo B, como la B3

2.2.4.5. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción antibacteriana de los propóleos es complejo y no está completamente establecido, pero en algunos estudios realizados, se sugieren como probables causas la desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, inhibición de la ARN polimerasa, inactivación del potencial de membrana e inhibición de la síntesis de proteínas (Takaisikikuni y Schilcher, 1994; Pepeljnjak y Kosalec, 2004). Se ha reportado que el flavonoide induce una fuerte pérdida de potasio en *Streptococcus*, lo que sugiere un daño en la membrana plasmática. La composición química del propóleo revela que los componentes farmacológicos activos más importantes son los flavonoides y varios compuestos fenólicos, terpenoides y aromáticos. Entre estos la apigenina (flavonoides) y el tt-farnesol (terpenoides) han demostrado tener las mayores propiedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans*, basados sobre todo en su capacidad de inhibir las glucosiltransferasas y en su efecto

bactericida; además, impiden la síntesis de glucanos y pueden influenciar en la composición química y microbiana de la placa dental. Sin embargo, en el propóleo tipo 6 del Brasil, la fracción hexano del EEP es la responsable de la acción inhibitoria potente contra *Streptococcus mutans* y la inhibición de las glucosiltransferasas.

2.2.4.6. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Desde tiempos anteriores el propóleo ha sido utilizado en el campo de la Medicina, debido a que presenta diversas propiedades medicinales ^{26, 27}:

- **Acción bactericida y bacteriostática:** El propóleos actúa con efecto antibiótico frente a cocos Gram positivos: *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*; frente a bacilos Gram positivos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus larvae*, (causante de la loque americana), *Corvne bacteriumequi*; frente a algunas especies (*Aspergillus ochraceus*) y frente a levaduras (*Saccharomy cescerevisiae*).
- **Tratamiento de enfermedades respiratorias:** Manifiestan resultados positivos al usar propóleos en el tratamiento de procesos tales como catarros de las vías respiratorias altas, gripe, sinusitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica, tuberculosis pulmonar (dentro de las afecciones del aparato respiratorio) ^{26, 27}.
- **Anestésico local:** Siendo muy estimado por su acción cicatrizante y antihemorrágica.

- **Previene las caries dentales:** Los extractos de pegamento de abeja limitan la placa bacteriana y reducen la caries dental. Algunos señalan que puede ayudar incluso a regenerar la pulpa dental, tejido óseo y del cartílago. Es eficaz en el tratamiento de la periodontitis y la gingivitis
- **Tratamiento anti parásito:** Ensayos preliminares muestran que puede eliminar parásitos. En un estudio las personas que tomaron própolis tuvieron una tasa de éxito del 52 al 60% en la eliminación del parásito de la giardiasis.
- **Acción dermatológica:** Tiene aplicación principalmente para procesos tales como abscesos, forúnculos, supuraciones diversas, sabañones, grietas, verrugas, callosidades, eczemas y psoriasis, entre otros.

2.2.4.7. EFECTOS ADVERSOS

En primer lugar, es importante considerar la dosis recomendada de propóleo en humanos para uso oral es 5 mg. por kg. de peso al día. Por ejemplo, si el paciente pesa, 75 kg., se le puede administrar una dosis de 375 mg. de propóleo, al día.

Actualmente no se han encontrado contraindicaciones sobre su uso, pero la Alergia al propóleo es un factor a tomar en cuenta para su consumo. Se sabe que cierto porcentaje de la población es alérgica al propóleo y quizá a otros productos apícolas: polen, jalea real, apitoxina (veneno de abeja), etc. Por ello, es necesario aplicar pruebas de alergia, antes de comenzar cualquier tratamiento con propóleo²⁷.

Las reacciones alérgicas al propóleo, surgen por lo general, en personas que son alérgicas a las picaduras de abejas, así como

en personas que ya padecen algún tipo de problema alérgico (asma bronquial, eccema, diabetes, urticaria, etc.).

En general, el propóleo no presenta efectos secundarios, salvo en raras excepciones que puede causar: sequedad en la boca, somnolencia, mareos y reacciones alérgicas.

2.2.4.8. USO DE PROPÓLEO EN ODONTOLOGÍA

En el campo de la odontología el propóleo tiene diversos usos²⁹, entre ellas encontramos la capacidad de reducir la sensibilidad dental y la permeabilidad de la dentina ha mostrado ser beneficioso en diversos aspectos, que incluyen, la prevención de la caries, la reducción de la mucosidad oral tras quimioterapia, el cáncer oral, en casos de enfermedades gingivales y periodontales, inhibición de la placa bacteriana y antiinflamatorio.

Es efectivo en caso de herpes virus y contra diversos microorganismos infecciosos como *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* o diversos tipos de *Candida*.

Asimismo, destaca por su poder antiplaca en casos de gingivitis causada por acumulación de placa bacteriana, y también dado que reduce la halitosis, está especialmente indicado para formular dentífricos. También tiene la capacidad de favorecer la cicatrización en casos de suturas.

2.2.4.9. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPOLEO

El extracto etanólico de propóleo es obtenido a través del método de maceración en contacto con el solvente etanol, para ello, se sigue el siguiente procedimiento:

- Recolección de la muestra.
- Pretratamiento: Limpieza de impurezas y secado de la muestra
- Reducción de tamaño: se tomó la muestra seca y se rallo.
- Extracción: se pesó en gramos una cantidad de material y se depositó en los recipientes dispuestos para tal fin, se adicionó el solvente etanol hasta cubrir completamente el material vegetal, se agitó y tapó.
- Reposo: se dejó reposar por un período de 15 días, agitando esporádicamente el contenido.
- Obtención del extracto: se filtró el producto, se recuperó el solvente con ayuda de un deshidratador de cajones, se envasó, pesó y almacenó el producto.

2.2.5. ORÉGANO

2.2.5.1. ETIMOLOGÍA

El término orégano proviene del latín *origānum*, que fue tomado del griego *origanon*, que deriva de la palabra *óros* (montaña) y la raíz griega *gan* (brillar, destellar o estallar de júbilo). Por lo tanto, se le da el significado de “alegría de las montañas³⁰”.

2.2.5.2. DEFINICIÓN

El nombre científico del orégano es *Origanum vulgare*, se define como aquella planta herbácea vivaz, de la familia de las Labiadas, con tallos erguidos, prismáticos, vellosos, de cuatro a seis decímetros de altura, hojas pequeñas, ovaladas, verdes por el haz y lanuginosas por el envés, flores purpúreas en espigas terminales, y fruto seco y globoso. Es aromático,

abunda en los montes de España, y las hojas y flores se usan como tónicas y en condimentos³⁰.

2.2.5.3. CARACTERÍSTICAS

El *Origanum vulgare* pertenece a la familia de las Lamiaceae (Labiatae) y es una planta que crece espontáneamente en los lugares soleados y áridos hasta 2000 msnm y es cultivada como planta aromática y por sus propiedades terapéuticas³¹.

El tallo es erguido, de sección cuadrangular, de 50-80 cm, ramificado y en la parte superior de color rojizo y bañado por una espesa pelusa. La raíz es un rizoma rastrero negruzco provisto de raíces fibrosas. Las hojas son ovalado-lanceoladas, de márgenes lisos o ligeramente dentados, provistas de un corto pecíolo, a menudo pubescentes. Las flores están recogidas en panículas en el ápice de los tallos y de un bonito color blanco - rosado – rojo, provistas de brácteas rojizo - moradas y son sobre todo hermafroditas de polinización entomófila por parte de abejas y mariposas²⁹.

2.2.5.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se han realizado investigaciones para determinar la composición química del orégano. Los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *O. vulgare* 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 carvacrol¹³.

2.2.5.5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL OREGANO

Considerando el gran número de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es importante decir que su actividad antimicrobiana, no se atribuye a un mecanismo en específico; sin embargo, existen algunos sitios de acción en la célula en donde puede ocurrir lo siguientes efectos: daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daños a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz. Una característica importante de los componentes de aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenándola la estructura y haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares. Los componentes de aceites esenciales como timol y carvacrol poseen fuertes propiedades antimicrobianas, provocando desorden en la membrana citoplasmática.

2.2.5.6. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

- **Antioxidantes para Reforzar el Sistema Inmunológico:**
Un agente activo del orégano es el ácido rosmarínico, que es un poderoso antioxidante que podría reforzar la salud de su sistema inmunológico. El orégano tiene una de las tasas

más altas de actividad antioxidante, 42 veces más poder antioxidante que las manzanas.

- **Antifúngico, Antibacteriano:** El carvacrol y el timol, dos fitoquímicos en el orégano, son poderosos antimicrobianos. Las investigaciones han demostrado que el aceite esencial del orégano podría matar patógenos transmitidos por los alimentos como la listeria y la súperbacteria MRSA.
- **Propiedades Antiinflamatorias:** El orégano contiene beta-cariofilina (E-BCP), una sustancia que inhibe la inflamación y también podría ser benéfica para tratar enfermedades como la osteoporosis y arteriosclerosis, así como el síndrome metabólico
- **Sirve para tratar enfermedades del Tracto Respiratorio Superior:** El orégano tiene una poderosa actividad antiviral y se encontró que un aerosol que contiene aceites esenciales aromáticos de cinco plantas, incluyendo el orégano, alivia significativamente los síntomas inmediatamente en personas con infecciones del tracto respiratorio superior.
- **Efectos que combaten el Cáncer:** El extracto de orégano produce la detención del crecimiento y la muerte celular de manera dependiente al tiempo y dosis en las células del cáncer de colon. Un fitoquímico en el orégano, el carnosol, también ha sido "evaluado por sus propiedades anticáncer en la próstata, de mamas, de piel, de leucemia y el cáncer de colon con prometedores resultados.

2.2.5.7. EFECTOS ADVERSOS

El orégano como planta aromática puede ser usado en diferentes dosis recomendadas. Sin embargo, una sobredosificación puede provocar alteraciones nerviosas debido a los efectos estimulantes de su aceite esencial sobre el sistema nervioso, la sobredosis puede provocar agitación, hiperestesia (exageración de los estímulos táctiles), depresión, entorpecimiento, somnolencia y excitación cardíaca⁶.

2.2.5.8. USO DEL ORÉGANO EN ODONTOLOGÍA

A través de investigaciones se ha evidenciado el potencial antibacteriano de 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 niger*, *Geotrichumy 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 activo¹³

2.2.5.9. OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare*

Para la obtención de los aceites esenciales, se llevó a cabo el método de arrastre con vapor de agua, el cual tiene el siguiente procedimiento:

- Recolección del material: Se recolectaron muestras representativas (calculadas en mínimos a partir de la capacidad del tanque extractor, así: hojas = 500 g) de cada una, y se sometieron a los tratamientos previos a la extracción.
- Pretratamiento de la materia prima:
 - Limpieza: se separó el material inorgánico y orgánico que no pertenecía a la especie a trabajar como: polvo, elementos ajenos y otros.
 - Separado: se hizo una separación manual en las partes principales de cada especie: hojas, ramas y otros.
- Reducción de tamaño: se cortó el material en partes pequeñas (1x1 cm hojas y corteza y de 1x1x1 frutos) para aumentar el área de contacto material - vapor.
- Determinación de la densidad real: se tomó una muestra de aceite, se pesó en una balanza de precisión de 3 cifras y se calculó el volumen en una fiola, se reportó el promedio como la densidad real del material.

- Carga e inicio de la extracción: se pesó el material, se tapó el tanque de extracción y se selló de forma hermética. Paralelamente se llenó el recipiente generador de vapor con agua suficiente para el transcurso de la operación (máxima permitida por la olla) y se sometió a calentamiento con ayuda de una estufa eléctrica.
- Toma de datos: se inició una vez comenzó la generación de vapor (tiempo cero). Los datos recopilados fueron: temperaturas a la entrada y salida del agua de enfriamiento, en la cámara de extracción y al condensado producido; caudal de agua de enfriamiento y de condensado. Tomados cada 10 minutos hasta terminada la operación, tiempo extracción = 90 min. Las temperaturas fueron medidas con un termómetro de mercurio de 110°C y los flujos con la técnica del cronómetro – balde, que para este caso fue una probeta plástica de 250 mL, debido al caudal de flujos trabajados.
- Separado y envasado del producto: transcurrido el tiempo de destilación, se suspendió el calentamiento, se recogió el producto con una jeringa de 3 mL y la mezcla agua – aceite, sobrante en el condensador se envasó y se dejó reposar por un período de 24 horas para luego retirar el aceite allí contenido. El producto fue envasado en recipientes de vidrio pequeños y refrigerados para su conservación.
- Control de calidad: Practicado solo a las especies seleccionadas.
 - Densidad: calculada como la relación entre el peso del aceite y el volumen del mismo.

2.2.6. GLUCONATO DE CLORHEXIDINA

2.2.6.1. DEFINICIÓN

El gluconato de clorhexidina es un fármaco antiséptico derivado del clorofenilbiguanido (bis-biguanida), de carga positiva (catiónica), con gran sustantividad (tiempo de acción prolongado), que posee un amplio espectro de acción sobre varios microorganismos. Asimismo, ostenta baja toxicidad y una fuerte capacidad para adherirse a mucosas, a la película adquirida y a los microorganismos¹⁴.

2.2.6.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Se une a las moléculas de carga negativa, fundamentalmente a grupos fosfato en los LPS (Lipopolisacáridos de la cápsula de bacterias Gram negativas) y grupos COOH de las proteínas, impidiendo el transporte de sustancias. En el caso del esmalte, se une a los iones de la hidroxiapatita. Este fármaco desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas, precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP (Trifosfato de Adenosina) y muerte celular.

En las bacterias Gram negativas, la Clorhexidina afecta la membrana exterior provocando la liberación de enzimas periplasmáticas. La membrana interna de estos microorganismos no es destruída, pero es impedida la absorción de pequeñas moléculas. A bajas concentraciones, la Clorhexidina exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida¹⁴.

Muestran una alta susceptibilidad a la Clorhexidina: *Streptococos sp*, *Estafilococos sp*, *Cándida albicans*, *Escheri chiacoli*, *Salmonellas sp* y bacterias anaeróbicas.

2.2.6.3. CONCENTRACIÓN

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, cuando es usado como colutorio, estas son al 0,12 % al 2 %, Por otro lado, en altas concentraciones se comporta como bactericida, mientras que a bajas concentraciones su acción es bacteriostática. Al respecto, el gluconato de clorhexidina es un potente antiséptico.

2.2.6.4. USOS EN ODONTOLOGÍA

- Infecciones bucales por diversas causas incluidas las producidas por roces de las prótesis dentales y como consecuencia de algunos tratamientos para el cáncer
- Prevención de infecciones en cirugía bucal (pre y postquirúrgicas)
- Quimio terapéutico para prevención de caries dental
- Como quimioterapia de apoyo al tratamiento periodontal
- Como sustancia irrigadora durante tratamientos radiculares
- Como desinfectante de cavidades antes de su obturación

2.2.6.5. EFECTOS SECUNDARIOS

Los efectos adversos de este medicamento son, en general, leves y transitorios en especial manchas pardas en los dientes, la lengua, prótesis y restauraciones de silicato y resina, así

como la alteración pasajera de la percepción gustativa y descamación de la mucosa oral.

En estudios realizados en animales no se han visto daños en el feto. No se conoce si la Clorhexidina pasa a la leche materna, aunque no se han descrito problemas en el lactante.

**CAPÍTULO III:
HIPÓTESIS,
VARIABLES Y
DEFINICIONES
OPERACIONALES**

3.1. HIPÓTESIS

3.1.1. HIPÓTESIS GENERAL

Existe mayor eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) en comparación del extracto etanólico de Propóleo sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

3.1.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Existe eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propóleo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Existe eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare*(orégano)sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Existe diferencia significativa entre la eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* y del extracto etanólico de Propóleo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE		INDICADOR	CATEGORIZACIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Agentes antibacterianos	Extracto etanólico de Propóleo	_____	Concentraciones de extracto etanólico de Propóleo	Nominal
	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	_____	Concentraciones del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	Nominal
	Gluconato de Clorhexidina (Grupo control)	_____	Concentración al 2%	Nominal
Eficacia antibacteriana sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175		Halos de Inhibición de crecimiento bacteriano (mm)	Resistente (-) si fue ≤ 9 mm	Ordinal
			Límite intermedio (Sensible = +) de 9 a 14 mm	
			Sensibilidad media (muy sensible = ++) > 14 a 19 mm	
			Sumamente sensible (S.S.= +++) ≥ 20 mm.	

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. DISEÑO

4.1.1 Tipo de investigación:

- Experimental- in vitro:

Porque se determinará en forma in vitro, la eficacia antibacteriana del extracto Etanólico de propóleo versus el aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. En condiciones rigurosamente controladas, con el fin de descubrir la causa de la que se produce una determinada situación u acontecimiento³⁰

- Analítico –prospectivo:

Asimismo, se caracteriza por ser de tipo analítico porque se busca la desmembración de un todo, en este caso el fenómeno de efecto antibacteriano, descomponiéndolo en sus partes, para así lograr un adecuado estudio y detectar sus posibles causas de las variaciones³¹. Por último, es de tipo prospectivo porque se realiza la observación de ciertas causas probables para realizar una anticipación aproximada y general de las tendencias que ocurrirían posiblemente en el futuro y que pudieran influir el fenómeno estudiado³².

4.2. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo se desarrollará Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, específicamente en la Facultad de Ciencias, Área de Microbiología, con la finalidad de emplear las propiedades antibacterianas del extracto etanólico de Propóleo y el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) en el ámbito odontológico, específicamente en el tratamiento y la prevención de la caries. Desarrollado entre los meses de Julio – Octubre.

4.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

- Población: Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Muestra: 33 Tratamientos en las placas Petri, con los respectivos agentes antibacterianos que fueron divididos en dos grupos y un tercer grupo control, además en cada grupo se utilizaron 44 discos (3 discos con el agente antibacteriano y un disco que no se colocó nada que fue el de control) para que cumplan los requisitos de inclusión en las cuales se dividirán en:

TAMAÑO MUESTRAL			
GRUPO I	Extracto Etanólico Propóleo	11 Tratamientos	3 discos 1 disco control
GRUPO II	Aceite Esencial de Origanum vulgare (orégano)	11 Tratamientos	3 discos 1 disco control
GRUPO III (control)	Gluconato de Clorhexidina	11 Tratamientos	3 discos 1 disco control

4.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cepa de "*Streptococcus mutans* ATCC 25175"
- Extracto Etanólico de propóleo
- Aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano)

4.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cepas de “*Streptococcus mutans*” que no pertenezcan al grupo viridans
- Placas petri contaminada y fracturadas.

4.4. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

4.4.1. INSTRUMENTO DOCUMENTAL:

- Ficha de recolección de datos:
De uso exclusivo del investigador, que está diseñada para registrar la actividad inhibitoria, las concentraciones y volúmenes de las variables, con los que se trabajaron además de registrar los halos de inhibición en milímetros que se formaron (Anexo N-.1)

4.4.2. INSTRUMENTOS:

- Recursos Materiales

4.4.2.1 Equipos:

- Autoclave.
- Estufa.
- Incubadora.
- Balanza analítica.
- Equipo de destilación.
- Nefelómetro de Mc Farland.
- Equipo de vórtex.

4.4.2.2. Materiales de vidrio:

- Frascos color ámbar grande y pequeño
- Tubos de ensayo
- Placas Petri de 10 x100 mm
- Matraces de 500 ml
- Matraces de 250 ml
- Matraces de 100 ml.
- Micropipetas de 10 μ l
- Micropipetas de 100 μ l
- Micropipetas de 1000 μ l.
- Vasos precipitados de 200 ml.
- Tubos de ensayo
- Tubo refrigerante en espiral
- Probeta de 10 ml

4.2.2.3. Medios de cultivo, reactivos y bacteria:

- Agar Müller Hinton
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- Oxoid 2.5 l sistema de anaerobiosis
- Alcohol de 70°C
- Ron de quemar
- Discos de sensibilidad Oxoid
- Bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 215175

4.2.2.4. Otros:

- Asa de Kolle
- Asa de drigalski
- Gradillas
- Espátulas
- Pinzas
- Papel Kraft
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos
- Guardapolvo
- Algodón
- 3 soportes universales
- 3 nueces
- 1 cocina
- Pabilo
- Papel aluminio
- Regla vernier
- Marcadores
- Calculadora
- Gasas
- Papel de filtro Wathman N°42

**CAPÍTULO V:
PROCEDIMIENTOS
DE ANÁLISIS DE
DATOS**

5.1. RECOLECCION DE LA MUESTRA

5.1.1. RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO:

En primer lugar, se procederá con la obtención del Propóleo derivado de la ciudad de Pucallpa y el embasamiento para su transporte. El propóleo de 500g será recolectado mediante condiciones de higiene, para impedir la contaminación de este, se separarán algunos componentes que no forman parte de ella como restos pequeños de madera, de hojas y otros, que puedan alterar su composición. Asimismo, para el transporte del propóleo desde el lugar de recolección hacia el laboratorio se realizará en frascos de vidrio estériles para evitar la contaminación del propóleo y se guardará en un área fresca a una temperatura ambiente .³³. (Anexo N°2)

5.1.2. PROCESAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO:

Para la extracción del Extracto etanólico de Propóleo, el propóleo será seleccionado de las impurezas se tomaron 4 bolas de propóleo y se colocaron en un frasco con una malla confeccionada para que se colaran los residuos de miel, luego será cortado en trozos pequeños y rallado en un vaso de vidrio precipitado de 1000ml, hasta obtener partículas diminutas y en un frasco de vidrio estéril, grande, color ámbar se colocó en su interior aproximadamente 100.42gr. Luego se añadió 500mL alcohol (70%) hasta que cubrió por completo el contenido, este frasco se agitó tres veces por día; después de 15 días de maceración a 37°C, se filtró varias veces a través de doble papel de filtro Wathman N°42; en un matraz de fondo redondo y así se obtuvo la solución etanólica del propóleo. Después será sometido a un equipo de deshidratador de cajones a 37°C para extraer el etanol, que tiene que ser eliminado totalmente.

La concentración de extracto etanólico de propóleo se obtendrá. Pesando en la balanza digital el extracto etanólico de propóleo una cantidad aproximada de 250 mg colocando en el frasco ámbar y agregando 1 ml de agua destilada. (Anexo N°2)

5.1.3. RECOLECCIÓN DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO):

Asimismo, para la obtención del aceite esencial, se recolectaron aproximadamente 3 kilos de orégano seco provenientes de la zona andina de Tacna (Candarave) la muestra recolectada se envolvió con papel Kraft y se embolsó en cajas de cartón con su respectivo rótulo y se transportó hasta su procesamiento posterior.

5.1.4. PROCESAMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO):

Una vez transportadas las hojas de *Origanum vulgare* (orégano) al laboratorio, éstas se limpiaron de impurezas, se secaron para su conservación y mantenimiento de los componentes del vegetal fresco y se evitó la proliferación de microorganismos, perfectamente a temperatura ambiente en un área fresca y seca resguardada de la luz para no alterar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la especie en estudio. Aproximadamente 500g de hojas secas deben ser sometidas a destilación, por el método de arrastre por vapor de agua, en un equipo de destilación. El equipo de destilación estuvo compuesto por un sistema de doble balón, uno de los cuales contuvo agua destilada (700 ml) y fue sometido a calor directo; mientras que en el segundo (Capacidad 1000 ml) contuvo 500 gramos de orégano, el cual fue el que recibía los vapores de agua, para que luego, el vapor producido arrastre los aceites esenciales hasta el refrigerante en espiral. Este cambio de temperatura hace que el vapor se condense y se vuelva nuevamente

líquido (agua- aceite). El producto destilado se recibió en un vaso de vidrio precipitado estéril, observándose un estado bifásico entre agua y aceite esencial, por la diferencia de densidades. Y utilizando las pipetas Pasteur se separó el aceite esencial para luego almacenarse en un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente y envuelto en papel aluminio para proteger de la luz del ambiente. La concentración del aceite esencial se obtendrá mediante :³⁴. (Anexo N°2)

Determinación de densidad

Donde:

d= densidad (g/ml)

m= masa (g)

v= volumen (ml)

W1= Peso probeta (g)

W2= Peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite= Volumen de aceite (ml)

Vol. aceite= 1ml.

W1= 16,2246 g.

W2= 17,1400 g.

$$d = m/v$$

$$d = \frac{W2 - W1}{1 \text{ ml}}$$

1 ml

$$d = \frac{(16,2246\text{g.} - 17,1400 \text{ g.})}{1 \text{ ml}}$$

1 ml

$$d = 0,9154 \text{ g/ml} = 915,4 \text{ mg/mL}$$

5.2. CEPA *Streptococcus mutans* ATCC 25175:

5.2.1 Obtención de las cepas en estudio

Las bacterias fueron obtenidas de un distribuidor de cepas bacterianas (GemLab), material biológico de referencia certificado, pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes ATCC: American Type Culture Collection. (Anexo N°02)

5.3. EVALUACIÓN DE LOS AGENTES ANTIBACTERIANOS:

La actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo y el aceite esencial de orégano, se evaluó por el método de Kirby Bauer (difusión en disco).

5.3.1 Preparación de la solución de extracto etanólico de propóleo:

Se usaron volúmenes de extracto etanólico de Propóleo (5µl - 30µl) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer); Se propuso trabajar con diluciones para obtener los datos de los halos de inhibición con respecto a las concentraciones del Extracto Etanólico de Propóleo. La dilución se hizo en una proporción donde se tomó 250 mg en 1ml (1000µl,) de agua destilada, para una mayor homogenización de esta solución se usó el equipo de vórtex. La tabla N.º 1 (pág. 62.), muestra los volúmenes y concentraciones empleadas en este trabajo. Las concentraciones se establecieron de la siguiente manera:

250 mg	←	1000 µl
X		5 µl

TABLA N°1: CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO EN LOS DISCOS

<i>EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO</i>		
<i>N° Tratamiento</i>	<i>Volumen (en ul)</i>	<i>[] (mg/ml)</i>
T1	5	1,25
T2	7.5	1,875
T3	10	2,5
T4	12	3,25
T5	15	3,75
T6	17,5	4,375
T7	20	5,0
T8	22,5	5,625
T9	25	6,75
T10	27,5	6,875
T11	30	7,5

FUENTE DE ELABORACIÓN PROPIA

5.3.2. Preparación de la solución de Aceite esencial de Orégano:

Se usaron volúmenes de Aceite esencial de orégano (2 μ l - 22 μ l) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer); Se propuso trabajar con estos volúmenes para obtener los datos de los halos de inhibición con respecto a las concentraciones del Aceite Esencial de Orégano. La tabla N.º2 (pág.64), muestra los volúmenes y concentraciones empleadas en este trabajo. Las concentraciones se establecieron de la siguiente manera:

$$d = 0,9154 \text{ g/ml} = 915,4 \text{ mg/ml}$$

$$\begin{array}{ccc} 915,4\text{mg/ml} & & 1000 \mu\text{l} \\ & \longleftarrow & \\ x & & 2 \mu\text{l} \end{array}$$

TABLA N°2: CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* (ORÉGANO) EN LOS DISCOS

Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)		
<i>N° Tratamiento</i>	<i>Volumen (en ul)</i>	<i>[] (mg/ml)</i>
T1	2	1,8308
T2	4	3,6616
T3	6	5,4924
T4	8	7,3232
T5	10	9,154
T6	12	10,9848
T7	14	12,8156
T8	16	14,6464
T9	18	16,4772
T10	20	18,308
T11	22	20,1388

FUENTE DE ELABORACIÓN PROPIA

5.3.3. Preparación de Gluconato de Clorhexidina:

Se usaron volúmenes de clorhexidina al 2% (5µl - 30µl) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).

Se hicieron las conversiones de porcentaje a mg. La tabla N.º 3 (pág.66), muestra los volúmenes y concentraciones empleadas en este producto. Las concentraciones se establecieron de la siguiente manera:

$$\begin{array}{ccc} 20000 \text{ mg} & & 100000 \text{ µl} \\ & \longleftarrow & \\ & \text{x} & 5 \text{ µl} \end{array}$$

TABLA N°3: CONCENTRACIONES DEL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA

<i>GLUCONATO DE CLORHEXIDINA</i>		
<i>N° Tratamiento</i>	<i>Volumen (en ul)</i>	<i>[] (mg/ml)</i>
T1	5	1
T2	7,5	1,5
T3	10	2
T4	12	2,4
T5	15	3
T6	17,5	3,5
T7	20	4
T8	22,5	4.5
T9	25	5
T10	27,5	5,5
T11	30	6

FUENTE DE ELABORACIÓN PROPIA

a) Preparación de los discos

Se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (previamente esterilizados) con una cantidad determinada de los agentes antibacteriano: Extracto etanólico de Propóleo, Aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y gluconato de clorhexidina. Para esto se utilizaron 11 tratamientos con 3 repeticiones por cada tratamiento. La esterilización consistió en la desnaturalización de los discos con antibióticos, que fueron colocados en un vaso beaker (Capacidad de 100ml) con agua destilada aprox. 80ml y llevados a la autoclave a una presión de 15 libras (121 ° C) por 15 minutos. Luego desechamos el agua destilada del beaker y los colocamos a la estufa para su secado a 170°C por 1 hora.

Control negativo: Que consiste en un disco de sensibilidad de antibiótico desnaturalizado el cual está impregnado con agua destilada para así descartar la actividad antimicrobiana del mismo.

Con el fin de saber entre cuales de estas concentraciones presenta mayor formación de halo; incubándolo a 37°C por un espacio de 24 horas. Se anotó la presencia y el tamaño del halo zona de inhibición

b) Preparación del inóculo Bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC 25175:

El agente bacteriano que se utilizó en el presente trabajo, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se cultivó en viales para su mantención; para luego ser activadas en Caldo BHI, se homogenizó las colonias se colocaron en agar muller hinton y se incubaron a 37 °C por el lapso de 24 horas para luego volver a colocarlas en caldo BHI pero por un espacio de 3 a 4 horas y seguidamente se estandarizó por comparación de turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland cuya población micótica es $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

c) Preparación del medio para la prueba de sensibilidad:

Se empleó el medio agar Müeller Hinton Se preparó el medio como indica la casa comercial (38 g en 1000 ml).

d) Inoculación de las placas:

Se inoculó la placa de agar Müeller Hinton utilizando la suspensión estandarizada de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se depositó 100µl del inóculo sobre la superficie del agar de cada placa

correspondientemente, mediante la técnica de diseminación hasta que el inóculo quede distribuido de modo homogéneo. Se dejó secar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente

e) Dispensación de los discos a las placas inoculadas:

Se procedió a utilizar las micropipetas a diferentes volúmenes para el Extracto Etanólico de Propóleo, Aceite Esencial de Orégano, Gluconato de Clorhexidina, luego se incorporó un disco 6 mm de diámetro previamente esterilizados (“Discos de sensibilidad sin antibióticos”), los discos fueron embebidos con:

- Extracto Etanólico de Propóleo: 5µl; 7,5 µl;10 µl; 12,5µl; 15 µl; 17,5 µl ;20 µl; 22,5 µl;25 µl; 25 µl;27,5 µl y 30 µl.
- Aceite Esencial de Orégano: 2 µl ;4 µl ,6 µl;8;10 µl;12 µl;14 µl;16 µl;18 µl;20 µl y 22 µl
- Gluconato de Clorhexidina: 5µl; 7,5 µl;10 µl; 12,5µl; 15 µl; 17,5 µl ;20 µl; 22,5 µl;25 µl; 25 µl;27,5 µl y 30 µl,

Durante 10 minutos para su mejor impregnación. Cada disco impregnado con Extracto Etanólico de Propóleo, Aceite Esencial *Origanum vulgare* (orégano),

Gluconato de Clorhexidina, fue tomado con una pinza estéril y se colocó sobre la superficie del agar, se presionó suavemente para asegurar el contacto con el medio. Se Colocaron 3 discos con las diferentes sustancias antibacterianas y un control en cada placa de agar con su respectiva concentración. Se emplearon un total de 33 placas para esta prueba.

f) Incubación:

Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18 - 24 horas para ver los halos de inhibición.

g) Lectura:

Posterior al periodo de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento con el vernier en unidades de milímetros. La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. El diámetro de esta zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Propóleo, aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano), y gluconato de clorhexidina sobre los microorganismos estudiados. Para interpretar los resultados se tomó como referencias las pautas por

DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983 que considera la eficacia antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 según los halos de crecimientos como:

Resistente (-) si fue ≤ 9 mm

Límite Intermedio (Sensible=+) de 9 a 14 mm

Sensibilidad media (muy sensible = ++)>14 a 19 mm

Sumamente sensible (S.S.= +++) ≥ 20 mm.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- a) Para el análisis estadístico de datos es importante la determinación del efecto inhibitor del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y el extracto etanólico de propóleo, sobre el crecimiento in vitro de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175; para ello se utilizará la estadística descriptiva para procesar y analizar la información en tablas y gráficos, esto se realizó con el apoyo de las herramientas informáticas tanto Excel 2016 como el software estadístico SPSS V21. Así mismo, se realizó una prueba con el estadístico t student para determinar si existe significancia estadística que permita aseverar si se cumple o no la hipótesis alternativa de la investigación.

CAPÍTULO VI:

RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS DE LA TABLA DE RESULTADOS:

6.1.1 TABLA DE RESULTADOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO (ANEXO N°1)

TABLA N.º 01
“GRUPO I RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (EFICACIA ANTIBACTERIANA) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO”

TABLA N°1 Extracto etanólico de Propóleo						
Extracto etanólico de Propóleo		N.º PLACA	Nº Disco 1	Nº Disco 2	Nº Disco 3	Promedio final HALOS
Volumen	[] (mg/ml)		Halos mm	Halos mm	Halos mm	
5	1,25	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
7,5	1,875	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
10	2,5	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
12,5	3,25	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
15	3,75	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
17,5	4,375	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
20	5	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
22,5	5,625	1	no hay halo	no hay halo	no hay halo	0
25	6,75	1	10,7	10,6	10,9	10,73333333
27,5	6,875	1	11,4	11,9	11,8	11,7
30	7,5	1	12,5	12,8	12,6	12,63333333
						11,6867

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla N.º 01, se observa que en total hubo 11 tratamientos con extracto etanólico de Propóleo cada uno de ellos se trabajaron con 11 volúmenes, cada placa Petri con sus 3 respectivos discos que contenían impregnado el agente antibacteriano.

En relación a la lectura del halo de inhibición (mm), se observa que, a partir de tratamiento 9 hay una reacción de inhibición.

Dando un promedio final del halo de inhibición de 11,686 mm.

Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas por DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983 que considera la eficacia antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 según los halos de crecimiento son:

- Resistente (-) si fue ≤ 9 mm

- Limite intermedio (Sensible=+) de 9 a 14 mm

- Sensibilidad media (muy sensible = ++) > 14 a 19 mm

- Sumamente sensible (S.S.= +++) si ≥ 20 mm.

Donde: El promedio final de los halos es 11,686 mm, según la categorización, demostraría que tiene un límite intermedio en este grupo.

6.1.2. TABLA DE RESULTADOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (orégano) (ANEXO N°1)

TABLA N.º 02
“GRUPO II RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (EFICACIA ANTIBACTERIANA) DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO)”

TABLA N.º 2 ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> (ORÉGANO)						
ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO		N.º PLACA	Nº Disco 1	Nº Disco 2	Nº Disco 3	Promedio final HALOS
Volumen	[] (mg/ml)		Halos mm	Halos mm	Halos mm	
2	1,8308	1	11,3	9,9	1,2	7,46666667
4	3,6616	1	17,3	16,8	17,1	17,06666667
6	5,4924	1	17,4	18,1	19,3	18,26666667
8	7,3232	1	18,9	19,3	19,6	19,26666667
10	9,154	1	22,2	23,1	25	23,43333333
12	10,9848	1	27,1	26,3	27,4	26,93333333
14	12,8156	1	34,8	34,8	35,2	34,93333333
16	14,6464	1	31,7	33,3	32,8	32,6
18	16,4772	1	35,4	39,2	38,9	37,83333333
20	18,308	1	50,4	50	50,1	50,16666667
22	20,1388	1	Supera el tamaño	Supera el tamaño	Supera el tamaño	0
						26,7967

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla N.º 02, se observa que en total hubo 11 tratamientos con aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) cada uno de ellos se trabajaron con 11 volúmenes, cada placa Petri con sus 3 respectivos discos que contenían impregnado el agente antibacteriano.

En relación a la lectura del halo de inhibición (mm), se observa que, a partir de tratamiento N°01 hay una reacción de inhibición, superando el tamaño de la placa en el tratamiento N°11.

Dando un promedio final del halo de inhibición de 26,796 mm.

Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas por DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983 que considera la eficacia antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 según los halos de crecimiento son:

- Resistente (-) si fue ≤ 9 mm
- Limite intermedio (Sensible=+) de 9 a 14 mm
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) > 14 a 19 mm
- Sumamente sensible (S.S.= +++) si ≥ 20 mm.

Donde: El promedio final de los halos es 26,796 mm, demostraría que es sumamente sensible es en este grupo

6.1.3 TABLA DE RESULTADOS DEL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA (ANEXO N°1)

**TABLA N.º 03
“GRUPO III (CONTROL) RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (EFICACIA ANTIBACTERIANA) DEL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA”**

GLUCONATO DE CLORHEXIDINA 2%						
CLORHEXIDINA		N.º PLACA	Nº Disco 1	Nº Disco 2	Nº Disco 3	Promedio final HALOS
Volumen	(mg/ml)		Halos mm	Halos mm	Halos mm	
5	1	1	No hay halo, bacteria resistente	No hay halo, bacteria resistente	No hay halo, bacteria resistente	0
7,5	1,5	1	No hay halo, bacteria resistente	No hay halo, bacteria resistente	No hay halo, bacteria resistente	0
10	2	1	8,8	8,5;8,2;8,4	8,2;7,3;7,6	8,8
12,5	2,4	1	9,9	9,4	9,8	9,7
15	3	1	9,4	10	10,7	9,7
17,5	3,5	1	10,7	10,3;10,6	10,4;10,9	10,7
20	4	1	11,4	11,9	11,7	11,6666667
22,5	4,5	1	12,6	11,5	12,3;12,5	12,05
25	5	1	12,8	12,8	12,8;13,1	12,8
27,5	5,5	1	12,7	12,8	12,6	12,7
30	6	1	13,1	13,8	14,5	13,8
						11,3241

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla N.º 03, se observa que en total hubo 11 tratamientos con gluconato de clorhexidina al 2% cada uno de ellos se trabajaron con 11 volúmenes, cada placa Petri con sus 3 respectivos discos que contenían impregnado el agente antibacteriano.

En relación a la lectura del halo de inhibición (mm), se observa que, a partir de tratamiento n°03 hay una reacción de inhibición, en los anteriores tratamientos la bacteria se mostró resistente.

Dando un promedio final del halo de inhibición de 11,324mm.

Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas por DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983 que considera la eficacia antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 según los halos de crecimientos son:

- Resistente (-) si fue ≤ 9 mm

- Limite intermedio (Sensible=+) de 9 a 14 mm

- Sensibilidad media (muy sensible = ++) > 14 a 19 mm

- Sumamente sensible (S.S.= +++) si ≥ 20 mm.

Donde: El promedio final de los halos es 11,324 mm, demostraría que según la categorización hay un límite intermedio en este grupo.

6.2. PRUEBA DE t DE STUDENT DE MUESTRAS INDEPENDIENTES

CUADRO N°1 PRUEBA DE t DE STUDENT DE GRUPOS I Y II

Estadísticas de grupo

	Tratamientos	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	p- valor
Crecimiento (mm)	Extracto Etanólico de Propóleo	3	11.686	0.95007	0.54852	0,004
	Aceite Esencial de <i>Origanum Vulgare</i> (Orégano)	10	26.796	12.36915	3.91147	

El cuadro N°1 muestra que el Aceite Esencial de *Origanum vulgare* (orégano) tuvo el mayor efecto en el crecimiento del halo con 26,796 mm frente al Extracto Etanólico de Propóleo, que obtuvo 11,686 mm al aplicar la prueba de t de student señala que existe diferencias estadísticas significativas entre los promedios puesto que el p-valor 0,004 es inferior al α 0,05

CUADRO N°2 PRUEBA DE t DE STUDENT DE GRUPOS I Y III

Estadísticas de grupo

	Tratamientos	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	p- valor
Crecimiento (mm)	Extracto Etanólico de Propóleo	3	11.686	0.95007	.54852	0,660
	Gluconato de Clorhexidina	9	11.324	1.69122	.56374	

El cuadro N°2 muestra que el Extracto Etanólico de Propóleo tuvo el mayor efecto en el crecimiento del halo con 11, 686 mm frente al gluconato de clorhexidina que obtuvo 11,324 mm al aplicar la prueba de t de student señala que no existe diferencias estadísticas significativas entre los promedios puesto que el p-valor 0,660 es superior al α 0,05

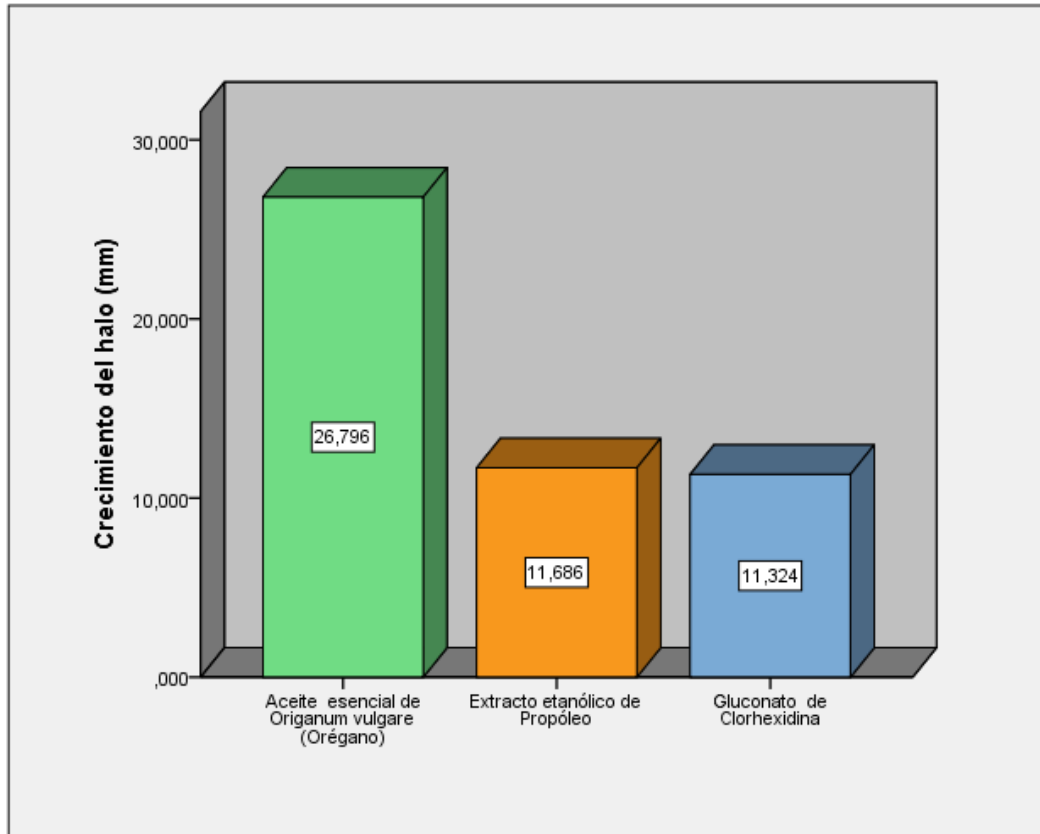
CUADRO N°3 PRUEBA DE t DE STUDENT DE GRUPOS II Y III

Estadísticas de grupo

	Tratamientos	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	p-valor
Crecimiento (mm)	Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	10	26.796	12.36915	3.91147	0,003
	Gluconato de Clorhexidina	9	11.324	1.69122	.56374	

El cuadro N°3 muestra que el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) tuvo el mayor efecto en el crecimiento del halo con 26,796 mm frente al Gluconato de Clorhexidina que obtuvo 11,324 mm al aplicar la prueba de t de student señala que existe diferencias estadísticas significativas entre los promedios puesto que el p-valor 0,003 es inferior al α 0,05

GRÁFICO N°1 CRECIMIENTOS DEL HALO (mm) EN RELACIÓN A LOS GRUPOS DE AGENTES ANTIBACTERIANOS



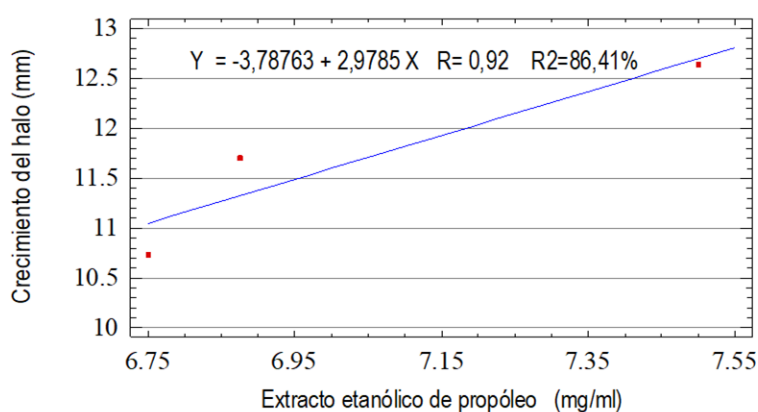
FUENTE: STRAGRAFICS 6,0

En el Grafico N°1 , muestra en las barras que el tratamiento a base Aceite Esencial de *Origanum vulgare* (orégano) obtuvo el mayor promedio de crecimiento del halo con 26,796 mm superando estadísticamente al resto y en el segundo lugar se ubica el extracto etanólico de Propóleo con 11,686 mm y en el ultimo lugar el gluconato de Clorhexidina con 11, 324 mm respectivamente tal como se observa.

6.3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN LINEAL

$$Y = a + bx$$

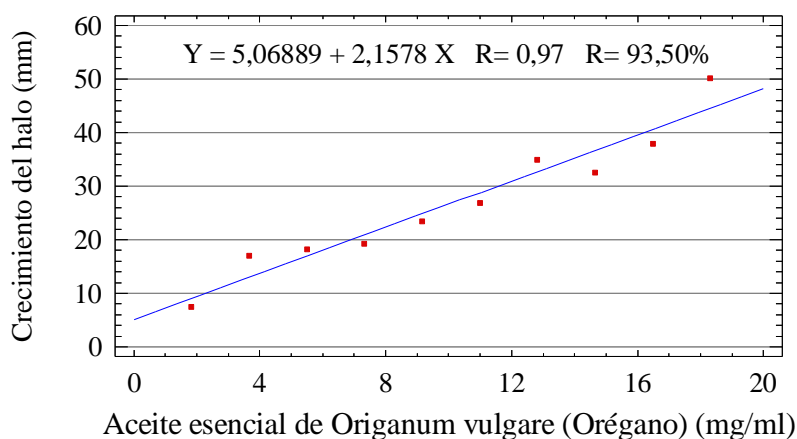
GRAFICO N.º 2: CRECIMIENTO DEL HALO (mm) EN FUNCIÓN AL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO (mg/ml)



FUENTE: STRAGRAFICS 6,0

En el Gráfico N.º 2, las diferentes concentraciones de extracto etanólico de Propóleo (mg/ml) se observa un efecto lineal siendo la ecuación resultante $Y = -3,78763 + 2,9785 X$ es decir que por cada unidad mg/ml de extracto etanólico de Propóleo el crecimiento de los halos se incrementa en 2,9785 mm, el coeficiente de correlación de Pearson $R = 0,92$ señala que existe una alta correlación positiva perfecta entre las variables. El crecimiento del halo en 86.41% se da por la acción antibacteriana del extracto etanólico de propóleo, la diferencia en porcentaje demuestra que la bacteria hizo resistencia por lo que no hubo formación de halo.

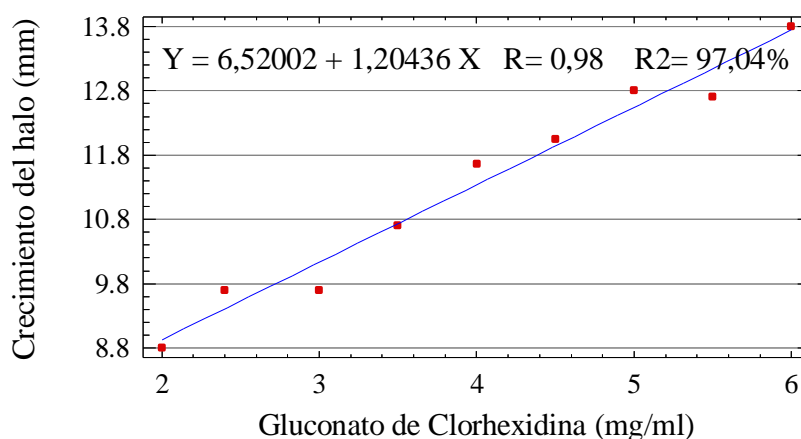
GRAFICO N.º 3: CRECIMIENTO DEL HALO (mm) EN FUNCIÓN AL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO)(mg/ml)



FUENTE : STRAGRAFICS 6,0

En el Gráfico N° 3 las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) (mg/ml) se observa un efecto lineal siendo la ecuación resultante $Y = 5,06889 + 2,1578 X$ es decir que por cada unidad mg/ml de aceite esencial de orégano el crecimiento de los halos se incrementa en 2,1578 mm, el coeficiente de correlación Pearson $R = 0,97$ señala que existe una alta correlación positiva perfecta entre las variables. El crecimiento del halo en 93.5% se da por la acción antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare*, la diferencia en porcentaje demuestra que la bacteria hizo resistencia al aceite, por lo que no hubo formación de halo.

**GRAFICO N. °4: CRECIMIENTO DEL HALO (mm) EN FUNCIÓN AL
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA (mg/ml)**



FUENTE : STRAGRAFICS 6,0

En el Gráfico N°4, las diferentes concentraciones de gluconato de clorhexidina (mg/ml) se observa un efecto lineal siendo la ecuación resultante $Y = 6,52002 + 1,20436 X$ es decir que por cada unidad mg/ml de gluconato de clorhexidina (mg/ml) el crecimiento de los halos se incrementa en 1,20436 mm, el coeficiente de correlación Pearson $R = 0,98$ señala que existe una alta correlación positiva perfecta entre las variables, . El crecimiento del halo en 97,04% se da por la acción antibacteriana de la clorhexidina, la diferencia en porcentaje demuestra que la bacteria hizo resistencia por lo que no hubo formación de halo.

**CAPÍTULO VII:
DISCUSIÓN,
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

DISCUSION

La caries dental sigue siendo la enfermedad bucal más prevalente en la actualidad, por lo que es importante la búsqueda de nuevas estrategias para prevenirla, más aún desde etapas iniciales.

En este contexto se decidió evaluar la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de Propóleo y aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al ser estos productos naturales consumidos y producidos en el mercado de materias primas. Además en recientes estudios colocan al orégano como un producto bandera en la ciudad de Tacna, no solo por su calidad sino también por su impacto en la economía, se decidió utilizar estos productos para determinar su eficacia sobre la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175 microorganismo catalogado como causante en la iniciación de la principal enfermedad bucal, la caries dental. Con un grupo control, que es el gluconato de clorhexidina estandarizado mundialmente como agente antibacteriano

De acuerdo al Objetivo de “*Evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanolito de propóleo versus el aceite esencial de Origanum vulgare sobre el Streptococcus mutans.*” se evidenció en el cuadro N°1 , Grafico n° 1 que si hay una diferencia significativa ,el aceite esencial de orégano tuvo el mayor efecto en el crecimiento del halo con 26,796 mm frente al extracto etanólico de Propóleo que obtuvo 11,686 mm. y la clorhexidina que tuvo 11,324 .Comparando con el trabajo de investigación **Eguizába y Moromi⁷ “Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus casei”** demostró que el extracto etanólico del propóleo peruano en solución al 0,8 % tiene una mejor acción antibacteriana contra *S. mutans* que la Clorhexidina al 0,12 %.Además comparando el trabajo de investigación del Dr. **Lara ¹⁴en “Efecto inhibidor del extracto oleoso del Origanum vulgare sobre el crecimiento in vitro de cepas de Streptococcus mutans”** se demostró que el aceite esencial de *Origanum vulgare* a sus dos concentraciones al 50 y 100% tienen mayor efectividad antibacteriana que el control positivo: Clorhexidina al 0.12%.

Otro estudio ha demostrado el efecto antibacteriano, donde **Rueda¹²** en “**Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de Propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans***” se demostró que a la lectura de los halos a las 48 hora se evidencio mayor inhibición para el gluconato de clorhexidina al 2%, que para los extractos acuosos de Propóleo, no descartando así el efecto antibacteriano de los extractos acuosos. Comparándolo con nuestro trabajo de investigación podemos plantear que el extracto etanólico de Propóleo tiene mejores efectos antibacterianos que un extracto acuoso versus la clorhexidina al 2%.

Concluyendo con la afirmación de que, “*El extracto etanólico de Propóleo y el aceite esencial de **Origanum vulgare**(orégano) tienen eficacia antibacteriana siendo este último el de mayor eficacia sobre la bacteria **Streptococcus mutans**.*”

Se evidenció también en el Cuadro N.º.02, que no hay una diferencia significativa entre el extracto etanólico de Propóleo y el Gluconato de Clorhexidina

En referencia al Aceite esencial de **Origanum Vulgare** (orégano) y el gluconato de clorhexidina, se evidenció en el Cuadro N.º 03, que el crecimiento del halo de inhibición(mm) si tiene diferencia significativa.

Sin embargo, podemos afirmar que, la eficacia antibacteriana mejora a la aplicación aceite esencial de **Origanum vulgare** (orégano) según las concentraciones.

Y por último se evidencio que por cada unidad de (mg/ml) de extracto etanólico de Propóleo el crecimiento de los halos se incrementa en 2,978 mm, Gráfico N.º.02 ,en el caso de aceite esencial de **Origanum vulgare** (orégano) por cada unidad de (mg/ml) se incrementa 2,1578 mm Grafico nº3 y en el Gluconato de Clorhexidina por cada unidad de (mg/ml) incrementa 1,20436 mm Grafico Nº4

CONCLUSIONES

- 1) Se logró evaluar la eficacia antibacteriana, por método de difusión Kirby Bauer demostrando que el extracto etanólico de propóleo y el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) presentan actividad antibacteriana in vitro frente a la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175, donde el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano), tuvo mayor crecimiento del halo con 26,796 mm frente al extracto etanólico de propóleo.
- 2) La eficacia antibacteriana resultó del halo de inhibición (mm) donde el extracto etanólico de Propóleo obtuvo una lectura de 11,686 mm, sobre la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175, según la categorización resultó un límite intermedio (Sensible=+) de 9 a 14 mm.
- 3) La eficacia antibacteriana se demostró del halo de inhibición (mm) donde el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) tuvo una formación del halo de 26,796 mm, sobre la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175, según la categorización resultó sumamente sensible (S.S.= +++) ≥ 20 mm.
- 4) La eficacia antibacteriana se demostró del halo de inhibición (mm) donde para el Gluconato de Clorhexidina tuvo una formación del halo de 11,324 mm, sobre la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175, según la categorización hay un límite intermedio de 9 a 14 mm en este grupo control.
- 5) Se logró comparar la eficacia antibacteriana con el grupo experimental I y II frente al grupo control que fue el gluconato de clorhexidina al 2% que resultó de la lectura del halo de inhibición obteniendo 11, 324 mm, demostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos es decir que al menos uno tiene promedio superior, en este caso el aceite esencial de *Origanum vulgare*. con 26,796 mm.

RECOMENDACIONES

- Promover la utilización y preparación de estos productos según los resultados obtenidos, ya que no presenta mayores efectos adversos al extender el tiempo de uso por ser un producto natural, caso contrario la clorhexidina al extender su uso provoca la eliminación de la microbiota oral.
- Se recomienda el uso *Origanum vulgare* (orégano) por ser de fácil acceso ya que gracias a este trabajo se demostró su eficacia antibacteriana superando incluso a la clorhexidina.
- Se recomienda hacer análisis de CMI Y CMB para complementar este estudio.
- Se recomienda hacer pruebas para su posterior uso en colutorios y pastas dentales con evaluación in vivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eguizába M, Moromi H. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontología Sanmarquina* [Internet]. 2007 [citado 11 abril 2017]; 10(2):18-20. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/odontologia/2007_n2/pdf/a06.pdf
2. Dentaaid [Internet]. Barcelona: Flores E.; 2017 [citado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://www.dentaaid.com/es/caries>
3. Fontana M, Young D, Wolf M, Pitts N, Longbottom C. Definiendo la caries dental para 2010 y en adelante. *Gaceta Dental* [Internet]. 2011 [citado 11 abril 2017]; 22(226): 23-31. Disponible en: <http://www.gacetadental.com/2011/06/definiendo-la-caries-dental-para-2010-y-en-adelante-2-26268/>
4. Noriega C. Definición de Propóleo. Propóleos [Internet]. 2011 [citado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://www.propoleos.es/propoleo/definicion-propoleo.html>
5. Medlineplus [Internet]. EE.UU.: Kapner M.; 2016 [actualizada 04 abril 2017, citado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001055.htm>
6. Sanchez M. Propiedades del orégano. *Botanical Online* [Internet]. 2013 [citado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalsoreganocastella.htm>

7. Pimentel Ramirez E, Castillo Andamayo D, Quintana Del Solar M, Maurtua Torres D, Villegas Vílchez L, Díaz Santisteban C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Estomatol Herediana* [Internet]. 2015 [citado 11 abril 2017]; 25(3): 268-277. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/reh/v25n4/a04v25n4.pdf>
8. Vaculik , Roque O, Cardozo J, Pérez S, Ramírez C. Acción antimicrobiana de extracto etanílico de propóleo sobre estreptococos mutans. *Odontología* [Internet]. 2014 [citado 11 abril 2017]; 16(1):81-86. Disponible en: <http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/ODONTOLOGIA/article/view/104/PDF>
9. Ayala Jara C, Castillo Saavedra E, Graus Mejía L. Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana. *Arnaldoa* [Internet]. 2016 [citado 11 abril 2017]; 23(1): 171-184. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/view/240/210>
10. Navarro JS, Lezcano , Mandri M, Gili M, Zamudio M. Utilización del propóleo en odontología. *RAAO* [Internet]. 2016 [citado 11 abril 2017]; 55(2): 19-22. Disponible en: <http://www.ateneo-odontologia.org.ar/articulos/lv02/articulo2.pdf>
11. Moreno Z, Martínez P, Figueroa J. Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Revista nova* [Internet]. 2007 [citado 11 abril 2017]; 13(3):70-75. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA7_70_75.PDF

12. Rueda Jácome M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra streptococcus mutans Quito. [Internet]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015 [citado 11 abril 2017]. Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4573/1/T-UCE-0015-154.pdf>
13. Escobar M, Torres A. Evaluación de la eficacia antibacteriana in vitro de un colutorio de aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (oregano) sobre *Streptococcus mutans*. . [Internet]. El Salvador: Universidad El Salvador; 2016 [citado 11 abril 2017]. Disponible en:
<http://ri.ues.edu.sv/11223/1/16103680.pdf>
14. De la Torre M. Aplicaciones del gluconato de clorhexidina. Revista de la asociacion de odontologia restauradora y biomateriales[Internet]. 2013 2015 [citado 11 abril 2017]. Disponible en:
http://www.odontologosecuador.com/espanol/artodontologos/gluconato_dental.htm
15. Lara Yonfá LL. Efecto inhibidor del extracto oleoso del Orégano vulgare sobre el crecimiento in vitro de cepas de Streptococcus mutans Quito. [Internet]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2017 [citado 11 abril 2017]. Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8270/1/T-UCE-0015-445.pdf>
16. Ortolá Siscar JC, Almerich Silla JM, Forner Navarro L, Llena Puy C. Caries Radicular: actualización. Odontoestomatología Práctica y Clínica [Internet]. 2015 [citado 11 abril 2017]. Disponible en:
http://www.infomed.es/seger/revistas/vol1_num3/formc3.html

17. Miguel Medrán B, Pastor Reinaldos M, Sarría Badillo B. Estado actual de la etiología de la caries dental. [Internet]. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos. 2007 [citado 11 abril 2017]; 13(1): 1-10. Disponible en: http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2006-2007_G13.pdf
18. Núñez D, García L. Bioquímica de la caries dental. Revhabancienméd[Internet]. 2013 [citado 11 abril 2017]; 9(2): 156-166. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004
19. Ecología bucal. [Internet]. Madrid: Ramirez J.; 2013 [citado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://www.odon.uba.ar/uacad/periodoncia/docs/unidadtematica2ecologiabuucal.pdf>
20. Ecología bucal. [Internet]. Santiago de Chile: Gajardo M.; 2010 [citado 11 abril 2017]. Disponible en: https://www.ucursos.cl/odontologia/2010/2/OD2303/1/material_docente/baja
21. Montes M, García JM. Género Streptococcus: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2007 [citado 18 abril 2017]; 24(3): 14-20. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-13>.
22. Rodríguez G. Géneros Streptococcus y Enterococcus. Temas de bacteriología y virología médica. [Internet]. 2011 [citado 18 abril 2017]; 17(1): 273-290. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>

23. Bratos M. Genero Streptococcus. [Internet]. 2012 [citado 18 abril 2017]; 12(1):21-26. Disponible en:
<http://microbiologia.blogs.uva.es/files/2014/03/2-Tema-12-Genero-Streptococcus-y-Enterococcus-2011-12.pdf>
24. Porte L, Braun S, Dabanch J, Egaña A, Andrighetti D. Streptococcus mutans: Una bacteria que hace honor a su nombre. Revista chilena de infectología [Internet]. 2009 [citado 18 abril 2017]; 26(6): 571. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v26n6/art17.pdf>
25. Propoleos [Internet]. Madrid: Ramirez M.; 2011 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: <http://www.propoleos.es/propoleo/definicion-propoleo.html>
26. Perez C, Jimeno F. Los propoleos de las abejas. [Internet]. Zaragoza: Hojas divulgadoras; 2005 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1987_07.pdf
27. Temas Sobre Salud. [Internet]. Madrid: Nasser J.; 2015 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: <https://temassobresalud.com/propoleo-abejas/>
28. Miel Sabinars del Arlanza. [Internet]. Burgos. Fuente L.; 2012 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: <http://www.mielarlanza.com/es/contenido/?iddoc=87>
29. 3MSalud. [Internet]. Barcelona: Flores L.; 2015 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: <http://www.3msalud.cl/odontologia/noticias/uso-del-propoleo-en-odontologia/>

30. Real Academia Española. [Internet]. Madrid: RAE; 2014 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=RAWhZZV>
31. Elicriso. [Internet]. Barcelona: Paredes P.; 2010 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: http://www.elicriso.it/es/plantas_medicinales/oregano/
32. Kerlinger F. Investigación del comportamiento. [Internet]. Santiago de Chile: MacGraw-Hill; 1979 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: https://derechofunlam.files.wordpress.com/2015/09/investigacion_del_comportamiento_-_kerlinger_fred_n.pdf
33. Academia. [Internet]. Bogotá: Llanos N.; 2011 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: http://www.academia.edu/5075869/CLASES_Y_TIPOS_DE_INVESTIGACION_Y_SUS_CARACTERISTICAS
34. García, L. Tipos y diseños de investigación. [Internet]. España: Centre Cochrane Iberoamericano; 2010 [citado 01 mayo 2017]. Disponible en: http://www.cochrane.es/files/Recursos/presentacio_LMartinez.pdf
35. Departamento Odontológico de la Unidad de Prevención para la Salud [Internet]. Barcelona: Morales, R.; 2016 [citado 18 abril 2017]. Disponible en: http://www.anep.edu.uy/anep/phocadownload/Publicaciones/Departamento_Odontologico/caries.pdf

ANEXOS

ANEXO 01: INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE REGISTRO DE ACTIVIDAD INHIBITORIA

- **Placa número:**
- **Cepa:**
- **Volumen:**
- **Concentración:**
- **Medio de cultivo:**

Fecha de lectura: .../.../...

Hora de lectura: .../.../...

	Extracto etanólico de Propóleo	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	Control gluconato de clorhexidina al 2%
Presencia de inhibición			
Ausencia de inhibición			

Fuente: Modelo de ficha de recolección tomado de Tesis Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans*.

FICHA DE REGISTRO DE DIAMETRO DE INHIBICION

- Placa número:
- Cepa:
- Concentración:
- Volumen:
- Medio de cultivo:

Fecha de lectura: .../.../...

Hora de lectura: .../.../...

	Diámetro de halo de inhibición
Extracto etanólico de Propóleo	
Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	
Control (gluconato de clorhexidina)	

Fuente: Modelo de ficha de recolección tomado de Tesis Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans*.

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla N°1

Extracto etanólico de Propóleo						
Extracto etanólico de Propóleo		N° PLACA	N° Disco 1	N° Disco 2	N° Disco 3	Promedio final HALOS
Volumen	[] (mg/ml)		Halos mm	Halos mm	Halos mm	

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Tabla N°2

Aceite esencial de <i>Origum vulgare</i> (orégano)						
Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>		N° PLACA	N° Disco 1	N° Disco 2	N° Disco 3	Promedio final HALOS
Volumen	[] (mg/ml)		Halos mm	Halos mm	Halos mm	

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Tabla N°3

Gluconato de clorhexidina						
Gluconato de clorhexidina		N° PLACA	N° Disco 1	N° Disco 2	N° Disco 3	Promedio final HALOS
Volumen	[] (mg/ml)		Halos mm	Halos mm	Halos mm	

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO 02: FOTOGRAFÍAS DE PROCEDIMIENTOS

Fig.N-.01: RECOLECCION DE MUESTRAS



Fig.N-.02: PROCESAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO



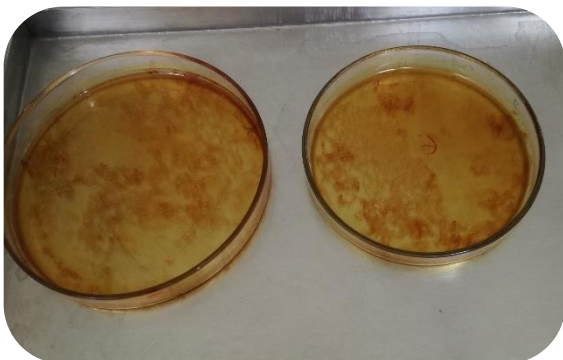


Fig.N-.03: PROCESAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO

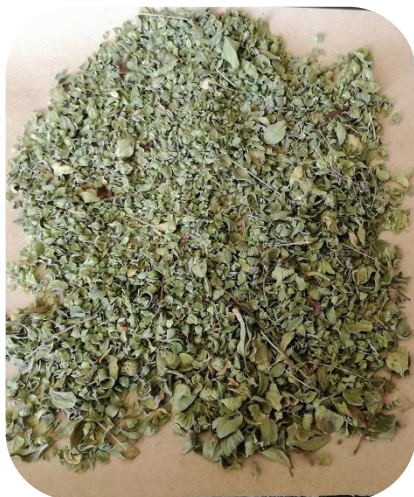


Fig.N-.04: CEPA



Fig.N-.05: PREPARACION DE LOS DISCOS



Fig.N-.06: PREPARACION DEL INOCULO BACTERIANO

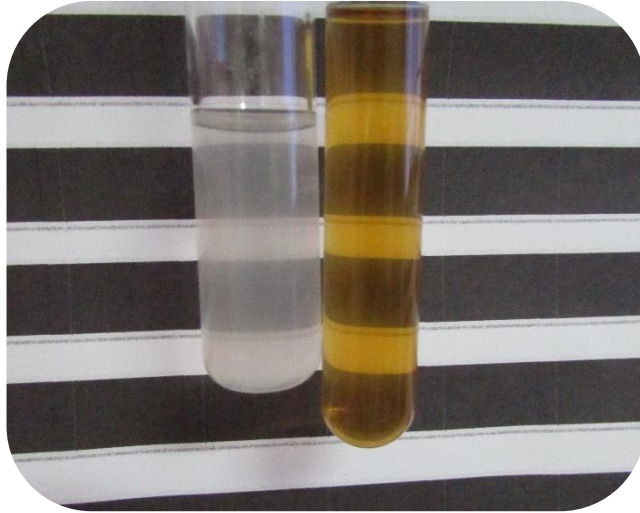


Fig.N-.07: PREPARACION DE PLACAS CON AGAR MULLER HINTON



Fig.N-.08: MICROPIPETAS



Fig.N-.09: INCUBACION

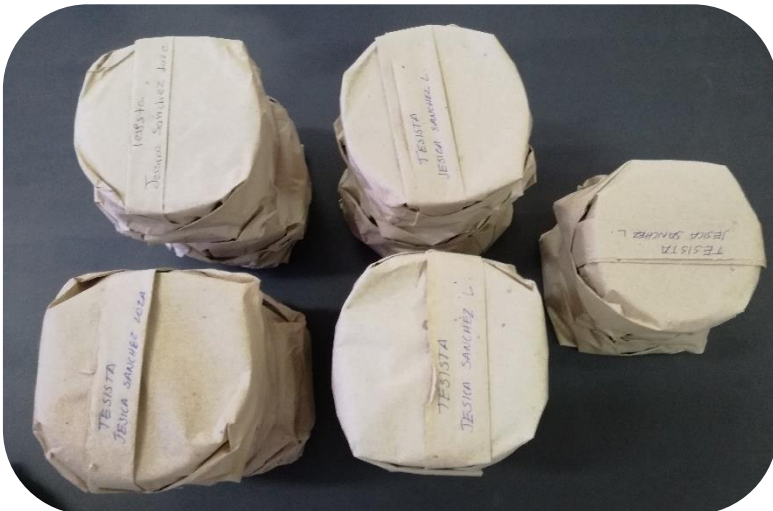




Fig.N-10: LECTURA



Fig.N-.11: RESULTADOS EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO



Fig.N-.12: RESULTADOS DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (orégano)

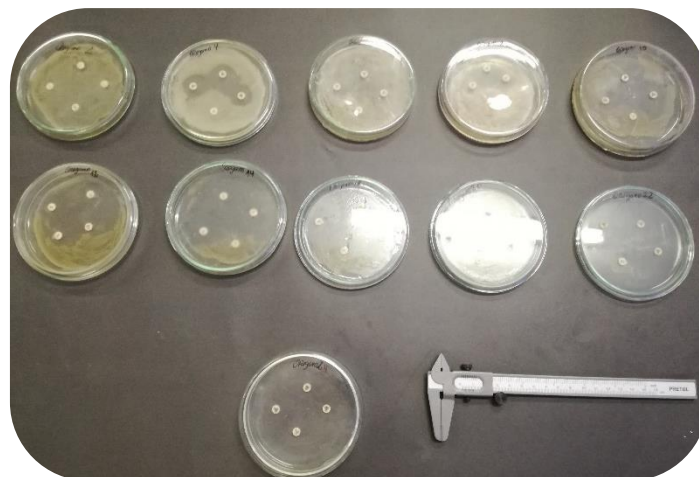


Fig.N-.13: RESULTADOS DEL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 2%

