



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

**“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE TRES
CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE
Origanum vulgare DE OTUZCO SOBRE Streptococcus
mutans ATCC 25175, TRUJILLO 2017”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO

DENTISTA

AUTOR:

JEAN JAVIER VILCA VARGAS

ASESOR:

MGTR. CÉSAR ABRAHAM VÁSQUEZ PLASENCIA

TRUJILLO – PERÚ

2019

TÍTULO DE LA TESIS

**“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE TRES
CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE
Origanum vulgare DE OTUZCO SOBRE Streptococcus
mutans ATCC 25175, TRUJILLO 2017”**

Equipo de trabajo

Investigador principal: Jean Javier Vilca Vargas

Asesor: Mgtr. César Abraham Vásquez Plasencia

Firma del jurado y asesor

Dr. Elías Ernesto Aguirre Siancas

PRESIDENTE

Mgtr. Edwar Richard Morón Cabrera

MIEMBRO

Mgtr. Juan Luis Pariazamán García

MIEMBRO

Mgtr. César Abraham Vásquez Plasencia

ASESOR

Agradecimiento

A DIOS por permitirme seguir mis sueños, guiar mi camino, y cuidar de mis seres queridos.

A mis padres Javier Vilca Arqueros y María del Carmen Vargas Vargas por mantenerse siempre a mi lado, por creen en mí, por esforzarse día a día para hacer de mí en un hombre de bien

A mis hermanos Sandra Milagros Vilca Vargas y Hector Alexander Vilca Vargas por ser mis amigos, mis confidentes, por su apoyo incondicional, por sus consejos y palabras de aliento, por sus regaños que me hicieron muchas veces reflexionar.

A mis amigos por todas las veces en que me apoyaron, por acompañarme el día a día en mi lucha por cumplir mis metas.

A mi asesor César Vásquez Plasencia por su constante apoyo en la realización de mi tesis, por guiarme todo el tiempo para hacer un buen trabajo.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos quienes me han apoyado de forma incondicional a pesar de los altibajos son mi razón de querer ser mejor cada día

A mi abuela Propetiza Arqueros García quien es mi ángel de la guarda que desde el cielo cuida mis pasos día a día y vela por mí y mi familia, por sus enseñarme que lo más valioso de una persona son los sueños porque son la razón de seguir luchando, por repetirme que nunca renuncie a los míos.

A Dios por darme salud y bienestar a mí y a mi familia, por darme las fuerzas para seguir adelante y librar todas mis batallas.

Resumen

Este estudio tiene por objetivo comparar, in vitro, el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) de Otuzco sobre *Streptococcus mutans*. ATCC 25175. Se recolectó *Origanum vulgare* y se preparó aceites al 10%; 25% y 50% mediante el método de Hidro-destilación. Las cepas de *S mutans* ATCC 25175 se activaron con caldo BHI y fueron cultivadas en caldo BHI más Tween y en agar Müller Hinton. Se realizaron 13 repeticiones por grupo experimental y se evaluó la sensibilidad bacteriana mediante el método de Kirby-Bauer. Se utilizó la prueba estadística de ANOVA previo análisis de normalidad de distribución de valores ($P<0.05$) y test de tukey para comparar los halos de inhibición. El aceite al 10% mostró un halo de inhibición promedio de 12.15mm, en la concentración de 25% mostró un halo de inhibición promedio de 16.38 mm y el de 50% un halo de inhibición promedio de 20.00.mm Se encontró diferencia estadística significativa entre las concentraciones ($p<0.05$). Se concluye que el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al 50% posee mayor efecto antibacteriano in vitro sobre *S. mutans* ATCC 25175, en comparación con las concentraciones de 10% y 25%

Palabras clave: *Origanum vulgare*, efecto antimicrobiano, *S. mutans*, caries dental

Abstract:

The objective of this study is to compare, in vitro, the antibacterial effect of the essential oil of *Origanum vulgare* (oregano) of Otuzco on *Streptococcus mutans*. ATCC 25175. *Origanum vulgare* was harvested and 10% oils were prepared; 25% and 50% by the Hydro-distillation method. Strains of *S. mutans* ATCC 25175 were activated with BHI broth and were cultured in BHI broth plus Tween and in Müller Hinton agar. 13 repetitions were made per experimental group and the bacterial sensitivity was evaluated using the Kirby-Bauer method. The ANOVA statistical test was used after analysis of normality of distribution of values ($P < 0.05$) and tukey test to compare inhibition halos. The 10% oil showed an average inhibition halo of 12.15mm, in the 25% concentration it showed an average inhibition halo of 16.38mm and that of 50% an average inhibition halo of 20.00mm. A statistically significant difference was found between the concentrations ($p < 0.05$). It is concluded that the essential oil of *Origanum vulgare* (oregano) at 50% has a greater antibacterial effect in vitro on *S. mutans* ATCC 25175, compared to the concentrations of 10% and 25%

Key words: *Origanum vulgare*, antimicrobial effect, *S. mutans*, dental caries

Contenido

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor	iv
4. Hoja de agradecimiento.....	v
5. Hoja de dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. abstract.....	viii
8. Contenido.....	ix
9. Índice de tablas.....	x
10. Índice de gráficos.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Revisión de la literatura.....	3
III Hipótesis.....	18
IV. Metodología.....	19
4.1. Diseño de la investigación.....	19
4.2. Población y muestra.....	19
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores...21	
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	22
4.5. Plan de Análisis.....	27
4.6. Matriz de consistencia.....	28
4.7. Principios éticos.....	30
V. Resultados.....	31
5.1. Resultados.....	31
5.2. Análisis de resultados.....	33
VI. Conclusiones.....	36
Aspectos complementarios.....	37
Referencias bibliográficas.....	38
Anexo.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. *Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones de aceite esencial de Origanum vulgare de Otuzco sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175”*31

Tabla 2. *Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de Origanum vulgare en concentraciones de 10%, 25%, 50% sobre Streptococcus mutans ATCC 25175*32

Índice de gráficos

Gráfico 1. <i>Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones y los controles positivo y negativo del aceite esencial de Origanum vulgare de Otuzco sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175”</i>	52
---	----

Introducción

La caries dental es una enfermedad infectocontagiosa y multifactorial caracterizada por atacar a los tejidos duros de las piezas dentarias debido a la desmineralización que produce el biofilm cariológico formado por distintos microorganismos; es la enfermedad dental más prevalente a nivel mundial.¹

El principal agente de la enfermedad caries dental es el *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), bacteria gram positiva anaerobia facultativa perteneciente a la cavidad oral, es el primer colonizador de la caries del biofilm cariogénico ya que al sufrir cambios en el ambiente causado por la deficiencia del paciente empieza a proliferar de manera sobrenatural llevándola a desarrollar sus factores de virulencia permitiéndole desmineralizar el diente y adherirse a los tejidos dentarios por medio de la metabolización de glucosa a través de sus glucosiltransferasas; las cuales además de permitir la adhesión de *S. mutans* a los tejidos dentarios permite la adhesión de las próximas bacterias causantes de la caries dental.^{1, 2}

El enfoque tradicional para el tratamiento de caries dental tanto en la fase preventiva como en la terapéutica ha estado fundamentado en tratar de eliminar la mayor parte de las bacterias a través de procedimientos mecánicos que en ocasiones van acompañados de un uso irracional de antimicrobianos los cuales ya han mostrado diversos efectos adversos siendo el de mayor preocupación la resistencia antibacteriana, es por ello que se ha optado por potenciar un ambiente saludable a través del uso de productos naturales para así preservar la salud.²

Entre los productos naturales se encuentran las plantas que poseen en sus metabolitos un sinnúmero de propiedades beneficiosas para la salud; una de las plantas que han

presentado propiedades antimicrobianas aplicables a la odontología es la denominada *Origanum vulgare* (orégano); planta nativa de la zona mediterránea que crece a lo largo de la zona sur del país en los departamentos de Moquegua, Tacna y Arequipa, principalmente.

El presente estudio tiene como objetivo Comparar, in vitro, el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) de Otuzco sobre *Streptococcus mutans* porque este es el principal agente causante de la caries dental, para lograr introducir al mercado productos naturales que apoyen con la prevención y tratamiento de caries dental a un costo accesible. Se recolectó *Origanum vulgare* y se preparó aceites al 10%; 25% y 50% mediante el método Hidro-destilación. Las cepas de *S mutans* ATCC 25175 se activaron con BHI caldo y fueron cultivadas en caldo BHI más Tween y en agar Müller Hinton. Se evaluó la sensibilidad bacteriana mediante el método de Kirby-Bover. El aceite al 10% mostró un halo de inhibición promedio de 12.15mm, en la concentración de 25% mostro un halo de inhibición promedio de 16.38 mm y el de 50% un halo de inhibición promedio de 20.00mm Se concluyó que el aceite de *Origanum vulgare* al 50% posee mayor efecto antibacteriano en comparación con las concentraciones de 10% y 25%

II. Revisión de la literatura

Antecedentes

Baca M et al.³ (Perú, 2016) “ Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon Citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus Aurantifolia Swingle* (Limón) Y *Citrus Sinesis* (Naranja), frente a cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans*”. determinaron el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Cimbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (orégano), *Citrus aurantifolia swingle* (limón) y *Citrus sinesis* (naranja) al 100%, usando gluconato de clorhexidina al 0.12% como control frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El aceite se hizo con el método de destilación por arrastre a vapor de agua y para el efecto antimicrobiano se sembraron las cepas de *S. mutans* en Agar Müeller Hinton y se empleó el método de difusión de discos para obtener los halos de inhibición. Los resultados mostraron que el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al 100% formó un halo de 15.889 mm; por lo que concluyeron que uno de los aceites que presenta mayor efecto antibacteriano sobre *S mutans* es el elaborado a base de orégano.

Morillas I.⁴ (Perú, 2015) “Efecto in vitro del aceite de *Origanum Vulgare* sobre *Salmonella Typhi*”. Se llevó a cabo un estudio de tipo comparativo, longitudinal, prospectivo, experimental. La población de estudio estuvo conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Salmonella*, aplicándoseles aceite de *Origanum vulgare* (orégano) observando su efecto antibacteriano para dichas cepas. Se observó que el aceite etanólico de *Origanum vulgare* (orégano) tuvo efecto inhibitorio frente a *Salmonella typhi* al comparar los halos de inhibición según escala de Duraffourd para

las cuatro concentraciones utilizadas obteniendo valores por encima de 20 mm con 0 UFC, teniendo como CMI 25%; además se observó una diferencia de dosis dependiente debido a que los grupos mostraron tener diferencia estadística significativa ($p < 0,05$). Comprobándose tener una eficacia del 100% sobre esta medida de la cepa frente al aceite etanólico de *Origanum vulgare* (orégano). Se concluyó que el aceite de *Origanum vulgare* (orégano) tiene efecto sobre *Salmonella typhi*, siendo la concentración inhibitoria mínima del 25%.

Abdul S et. al.⁵ (Iraq, 2012) “In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare* and *Rosmarinus Officinalis* Against Dental Caries Pathogens”, estudiaron la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* contra *Streptococcus mutans*, a través de la formación de los halos de inhibición. Todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana, donde el extracto de *Origanum vulgare* tuvo efecto inhibitorio a una concentración de 200mg/ml formando halo de 10 mm de diámetro frente a *S mutans*. Por lo que concluyen que *Origanum vulgare* posee grandes propiedades antibacterianas por lo que se podría usar como fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos que buscan curar la caries dental.

Maraví G et. al.⁶ (Perú 2012) “Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028”, determinaron el efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) al 50 y 100% mediante el método de difusión en agar utilizando discos

embebidos en los distintos aceites para formar halos de inhibición, sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028; asimismo empleó clorhexidina al 0.12% como control. Los resultados mostraron que al someter el aceite esencial de orégano a *S. mutans* éste formó un halo de inhibición de 25.72 mm al 100% y 8.53 mm al 50% por lo que concluyeron que el aceite esencial de orégano es mejor para inhibir a *S. mutans*, y recomiendan hacer más estudios.

Chávez L et al.⁷ (Perú, 2008) “Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*”, el presente trabajo experimental se realizó en el Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación en Bacteriología Alimentaria (CLEIBA). Se trabajó en placas Petri conteniendo *E. Coli* ATCC 25922, aceite esencial de orégano y Gentamicina. . Se aplicó el método de Kirby Bauer (discos de difusión) en 20 placas Petri. Se aisló la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. El grupo Experimental fue tratado con discos de papel filtro, embebidos con Gentamicina y aceite esencial de orégano al 75%; mientras que el grupo Control, con discos de Gentamicina sola. Se realizó la medición de los halos y se registraron los datos. Se evaluó el diámetro de los halos de inhibición; los halos de inhibición del grupo experimental resultaron 22,375 mm., mayores que los del grupo Control (20,75 mm). La prueba T determinó que la diferencia era estadísticamente significativa, $p = 0,001$ ($p < 0,05$). Se concluyó que existe un efecto sinérgico antibacteriano in vitro entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y la gentamicina en *E. coli*.

Busatta C et. al.⁸ (Brasil 2007) “Evaluación del aceite esencial de *Origanum vulgare* como agente antimicrobiano”, analizaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) frente a distintas bacterias entre ellas

cepas de *S. mutans*, a través de difusión en agar empleando discos empapados con el aceite para generar un halo de inhibición. Los resultados mostraron un efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano con 0,69 mg / ml frente a *S. mutans* formando un halo de inhibición 16.5 mm por lo que concluyeron que el aceite esencial de orégano posee un buen rendimiento y es una tentativa para emplearse como agente antibacteriano frente a distintos microorganismos.

Albado E et al.⁹ (Perú, 2001) “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare*”, el aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y flores desecadas de *O. vulgare*; se determinó la gravedad específica con un pinnómetro y el índice de refracción con refractómetro de Abbc; la composición química se evaluó mediante cromatografía de gas con detector de masa (GLSM). La actividad antimicrobiana del aceite de *O. vulgare* se realizó por el método semicuantitativo de incorporación y de disco difusión en agar. La densidad específica del producto resultó 0.9234 a 20°C y el índice de refracción 1.4774; el cromatograma mostró un contenido de 9% de Carvacrol, 12.19% de Terpeneol, 6.86% de Pcimeno y la presencia de otros compuesto relacionados metabólicamente con los tres antes citados. Las bacterias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella tiphyurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae* y las bacterias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, mostraron diferentes grados de sensibilidad. De los microorganismos evaluados solo *Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia. El aceite esencial posee actividad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *P. aeruginosa*.

1.1. Bases teóricas de la investigación

1.1.1. Caries dental

Concepto

Es una enfermedad de carácter infeccioso por ende transmisible, altamente prevalente a nivel mundial caracterizada por la destrucción de los tejidos duros de las piezas dentarias debido a la acción de ácidos que producen algunos de los microorganismos que conforman el biofilm cariológico.^{1,10}

Incidencia

Según la fuente del Ministerio de Salud en el Perú, 98 de cada 100 personas en el país presenta caries, dental debido a que la incidencia de Perú es similar a la de otros países sobre todo los subdesarrollados, la lleva a ser considerada como un problema para la salud pública a nivel mundial; ya que afecta si o si la calidad de vida de todos aquellos que la padecen.¹¹

Fisiopatología de la caries:

La lesión inicial de la caries comienza por una desmineralización en la región subsuperficial del esmalte, más lábil a los ácidos, que difunden a través de los intersticios interprismáticos de la capa superficial, más resistente. Se presenta como una mancha blanca, que hay que diferenciar de una zona hipocalcificada. Suelen desarrollarse dentro de los 18 meses que siguen a la erupción del diente.¹²

La lesión puede permanecer sin cambios, revertir espontáneamente a avanzar hasta que, debido a la pérdida de soporte, la capa superficial se desmorona y aparece una cavidad. Cuando esto ocurre, la lesión es clínicamente detectable, produciéndose la

invasión bacteriana e iniciándose la desmineralización y la rápida contaminación de la dentina. La lesión avanza en profundidad y lateralmente, destruyéndose la matriz de colágeno por las bacterias proteolíticas. La llegada de los gérmenes a la pulpa produce pulpitis, que cursa con dolor intenso ¹²

Las caries suelen iniciarse en las fosas, las fisuras y los contactos interproximales del esmalte, no afectándose el cemento a menos que esté expuesto al ambiente oral por retracción de las encías, las superficies más sensibles son las oclusales y las interproximales.¹³ Si no se detiene, se observa necrosis pulpar, el diente se oscurece y se produce periodontitis periapical y absceso local agudo (flemón) o crónico (granuloma), que actuando como foco infeccioso, puede producir bacteriemia e infecciones a distancia.¹⁴

Fase prepatogénico:

Se localizan interactuando todos los componentes etiológicos de la caries y son¹⁰:

- ❖ **Agente causal:** son microorganismos ubicados en la película dentobacteriana, concretamente capacitadas para crear un ácido orgánicos y polisacárido extracelular, especialmente estreptococo mutans, estreptococos *sanguis*, *lactobacillus acidophilus*, *actinomyces naeslundii* y *actinomyces viscosus*.

- ❖ **Huésped:** Estos componentes emplazados en la sucesión de la caries son las figuras de un cuerpo susceptible. Es por ello que dientes y específicamente sus organos mineralizados personifican al huésped, ya que la contusión cariosa

que tiene una iniciación ordinaria en el esmalte, donde sucede una mineralización preliminar producida por los ácidos bacterianos.

- ❖ **Ambiente:** El elemento circunstancial más significativo de las caries dentales es la figura de hidratos de carbono los cuales son fermentadores en cada dieta, y dentro de estos carbohidratos los más cuantiosos son los azúcares y el almidón.

- ❖ **Tiempo:** Se cree que esta dolencia crónica por lesiones cariosas es debido a las contusiones que despliegan durante un lapso de tiempo aproximado entre varios meses o años, por otro lado las apreciaciones clínicas indican la ligereza con la que una lesión cariosa tarda aproximadamente entre 6 a 18 meses antes de sus primeras manifestaciones. Asimismo sabemos que el esmalte inmaduro (recién formado) es el más vulnerable a lesiones cariogénicas

Periodo Patogénico Precoz:

Excepto en situaciones como una exclusiva patogenicidad, la alineación de nuevas contusiones cariosa las cuales pueden tardar meses e incluso muchos años, por lo consiguiente tenemos que la iniciación de un proceso de desmineralización es reemplazado con períodos de remineralización, aventajadas por iones de calcio, fósforo y flúor derivados en la saliva. Siendo habitual que este dispositivo dinámico de pérdidas y fijaciones presenten un tiempo largo, porque sólo frente a un caso de arqueo negativo, se iniciara la enfermedad.¹⁵

Existen solo dos manifestaciones clínicas, la evolución de la caries y Las lesión incipiente que manifiesta.¹⁵

Las primeras manifestaciones cariogénicas son designadas como pigmentaciones blancas y pertenece a una variación subsuperficial recubierta por el esmalte que aparentemente se encuentra sano y microscópicamente podemos descubrir poros de aproximadamente 200 armstrongs de longitud, los cuales notifican la faceta con el terreno afectado observando así la merma de iones magnesio y carbonato, continuo con una separación de iones calcio y fósforo.¹⁵

Periodo patogénico avanzado:

Cuando evidenciamos que esta lesión logra avanzar hasta la dentina, a través de una observación microscópica evidenciamos diferentes bandas de la lesión en los canalículos de la dentina de forma mínima en el caso de contusiones cariosas que avanzan paulatinamente (o crónicas) así como también se les puede confundir con las lesiones de rápido progreso (agudas); siendo la diferencia en que las lesiones agudas sufren una rápida descomposición y desmineralización.^{15, 16}

Importancia del *Streptococcus mutans* en el desarrollo de caries dental:

La atribución de factor principal de los microorganismos siempre será la etiología de la caries dental fue introducido por Miller en 1890, ya en años posteriores se pudo identificar las bacterias indicadas como primordiales siendo: *Streptococcus mutans* según Clarke en el año 1924 y por consiguiente los *Lactobacillus* por Buntig y Palmerlee en el año 1925.²

Experimentaciones iniciales manifestaron que roedores separados de gérmenes eran capaces de desplegar caries dental cuando se contagiaban con microbios. Las certezas de la transmisibilidad de la caries dental vienen de estudios ejecutados en hámster. Por otro lado los animales sin manifestaciones de caries dental no desarrollaban la enfermedad aun estando bajo una dieta potencialmente cariogènica. Ello solo sucedía cuando estos animales serian puestos en relación con animales que si tenían caries dental.¹⁶

Subsiguientemente se evidenció que los *Streptococcus* separados de lesiones cariosas en ratas, eran contagiados en la cavidad bucal de ratas libre de gérmenes, estos estaban aptos para desarrollar potencialmente la enfermedad.¹⁶

Gracias a estas premisas se puede deducir fácilmente que si se lograra un control microbiano adecuado, es decir la eliminación de los microorganismos patógenos junto a la preservación de la flora saprofita (que constituye una defensa), se podría erradicar completamente la caries, sin darle mayor importancia a los otros factores. Claro que estos resultados se consiguen en laboratorio, donde las bacterias no colonizan superficies si no es por inoculación; por esto cabe destacar que también se descubrió en otros estudios que la emigración y elaboración de caries por muchos *Streptococcus* bucales sucedía simplemente en presencia de sacarosa.¹⁶

Streptococcus mutans

Características

Generales

Streptococcus mutans es una bacteria en forma de cocos Gram positiva, que crecen en vínculos cortas de entre 4 a 6 cocos con una medida de 0,5 a 0,8 μ de radio, es una bacteria anaerobia facultativa perteneciente a una flora microbiana habitual de la

cavidad orofacial y las vías respiratorias nasales. Su temperatura óptima para desarrollarse es $36 \pm 1^\circ \text{C}$. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, ya que se puede encontrar en forma de coco o de forma más alargada como bacilo.

16,17

Taxonomía (Fernández, 2008)

Dominio: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae

Género: Streptococcus del grupo A de Lancefield

Grupo: Viridans

Especie: *S. mutans*¹⁸

Hábitat

Su primordial lugar de proliferación es la superficie de los dientes en los seres humanos. Encontrándose así de manera constante en la cavidad oral después de la erupción dentaria, correspondida esencialmente a que solicita la representación de tejido sólido no descamativo para su desarrollo.^{17,19}

Medio de cultivo

Para la cultivación de *Streptococcus mutans* comúnmente se emplea el medio de cultivo Infusión de Cerebro Corazón (BHI), ya que debido a la gran cantidad de

nutrientes que presentan una eficacia en la siembra de bacterias como *Streptococcus*, *Neumococos*, *Meningococos* y otros.⁶

Poder patógeno

Esta correlación *S. mutans*-caries, establecen sucesivas características: Aumento gradual propensos a lesiones cariosas activas; la actividad de incitación de la enfermedad con animales de experimento y amparo. Quedando completamente protegidos frente a antígenos del microorganismo con elementos de virulencia coherentes en relación con dichos métodos.⁶

Factores de virulencia

Estas serán situaciones o peculiaridades determinadas que crean patógenos y microorganismo dentro de las cuales tendremos:

- **Acidogenicidad:** el *Streptococcus* tiene la capacidad de fermentar los azúcares para originar primariamente ácido láctico como principal fruto del metabolismo. Haciendo una degradación del pH logrando así la desmineralización del esmalte dentario.
- **Aciduricidad:** La capacidad de poder originar ácidos en un ambiente con pH ácido.
- **Acidofilicidad:** Los *Streptococcus mutans* logra oponer resistencia frente a la acidez del ambiente, por lo concernientes las lesiones cariosas que ocurren en fisuras, sobre superficies lisas o cuello y raíz. Los altos grados de infección por *Streptococcus mutans* enaltecen el riesgo de padecer lesiones caries.¹⁶

La fitoterapia

Rama que estudia el uso de los productos de origen vegetal con objetivos terapéuticos, ya sea para advertir, para mitigar o para aliviar una fase patológico.¹⁹

Las plantas son utilizadas desde épocas muy remotas como parte de tratamiento en diversas dolencias. La colectividad de éstas muestra diversos efectos orgánicos variados, debido a la representación de sus innumerables principios activos.¹⁹

Plantas medicinales

Se considera planta medicinal a cualquiera que en sus órganos contengan sustancias las cuales puedan utilizarse con propósito terapéuticos y pueden ser embajadores para la industria químico- farmacéutica. Por otro lado la etnobotánica investiga el discernimiento botánico por encargo de colectividades nativos, alcanzando una íntima correlación entre las plantas y personas que lo emplean.^{19, 20}

Las plantas son de gran provecho, porque de ellas son derivadas incalculables núcleos químicos, en la actualidad coexisten diversas plantas las cuales contienen compuestos químicos antibacterianos y antifúngicos, otorgándonos una variedad incalculable que podemos emplear en la Odontología.^{5,6,19,21}

Clasificación botánica

Phylum: Euphyta

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledone

Orden: Tubiflorae

Familia: Labiatae

Género: *Origanum*

Especie: *Origanum vulgare*

Características

El orégano concerniente al género *Origanum*, familia Labiatae, congrega plantas herbáceas, perennes, matosas, procedentes de las tierras mediterráneas. Progresa espontánea en las zonas cálidas, desérticas hasta 2000 m.s.n.m., es labrada por su gran aroma y por sus propiedades terapéuticas.^{19, 22}

Etimología

Su nombre radica del griego "oros que significa cumbres" y de "gamos que significa resplandor, delicia" vale a decir "júbilo de las cumbres" porque la etapa espontánea maquilla con sus pequeñas flores las diversas cumbres lisas y rocosas.^{19, 22}

Hábitat y distribución

Origanum vulgare L. (Orégano) es una planta perpetua, patrimonial a la raza Lamiaceae. Originario de la región del Mediterráneo, igualmente cultivado en Europa, Asia y Taiwan y en América del Sur. Su transcendental productor es Chile seguido de Perú, siendo también cultivada en Bolivia, y en menor cantidad en países como Argentina y Uruguay.^{19, 22}

Usos

Las hojas de oregano son empleadas como aliños y también forman parte de la industria alimentaria, así mismo son importantes en la elaboración de maquillajes,

medicamentos y bebidas alcoholicas.⁶

Principios activos y propiedades

El orégano (*Origanum vulgare*) tiene bondades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, desinfectantes, se identifica por sus componentes activos carvacrol y timol la cual confiere a esta planta un excelente dominio antibacteriano.^{18, 23}

Relación orégano con *streptococcus mutans*

La razón del presente estudio radica en la composición de aceites esenciales del orégano. El aceite esencial de *Origanum vulgare* es una mixtura confusa de líquidos que poseen una elevada volatilidad, por lo que llega a evaporarse en al mezclarse con el viento. conseguidos de las diversas partes que presenta la plantas como petalos, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Químicamente se encuentran desarrollados por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, que logran ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos), sustancias azufradas y nitrogenadas.^{24, 25}

Son considerados beneficiosos los metabolismos secundarios de las vegetaciones y de igual similitud algunos alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas. La constitución química puede llegar a ser afectadas debido al medio ambiente, la naturaleza de la planta y el procedimiento de extracción.^{26, 27}

Se han reconocido elementos químicos en la constitución del orégano y sus aceites esenciales a flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, combinados terpénicos y derivados del fenilpropano, asimismo se ha descubierto ácidos coumérico, ferúlico, caféico, r-hidroxibenzóico y vainillínico. La

subespecie *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca, varía entre 2% y 6%. Este porcentaje se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo, y por la época de recolección, siendo este más bajo en el otoño.^{26, 27}

El aceite del orégano que progresa en un perfil silvestre se ha evidenciado que un aumento en las proporciones de timol provoca una disminución en el contenido de carvacrol.²²

Se analizaron muestras de orégano procedentes de tierras colombianas, los datos obtenidos por GC-MS del aceite esencial de orégano evidencian los principales componentes químicos, destacando el Timol (67.51%) como mayoritario, continuo por p-Cimeno, γ -Terpineno, cariofileno, oxido de cariofileno, trans- α -Bergamoteno, Eugenol, y α -Bergamoteno, con 11,66%, 5,51%, 5,38%, 2,22%, 1,65%, 1,49%, y 1,32% proporcionalmente, que personifican más del 80% del total inscrito.²⁸

Timol, carvacol y P-cimeno son los principales componentes a los cuales se les atribuye los efectos antibacterianos del orégano, conocido efecto basado en su composición fenólica y estructura química capaz de afectar la permeabilidad de la membrana celular gracias a la localización del grupo hidroxilo en el anillo fenólico^{28,}

²⁹.

III. Hipótesis

El aceite al 50 % tiene mayor efecto antibacteriano in vitro que las concentraciones 10% y 25% de aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

III. Metodología de la investigación

4.1. Diseño de la investigación

El presente trabajo de investigación presentó un diseño.³⁰

Experimental, porque requiere la manipulación intencional de una o más variables independientes, para analizar las consecuencias que esta tiene sobre la o las variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador.³⁰

Prospectivo, porque evalúa la exposición de una posible causa seguida a través del tiempo en una determinada población. Hasta obtener la aparición del efecto.³⁰

Transversal, puesto que se realizó la recolección de datos en un tiempo único.³⁰

Analítico, porque está diseñado para evaluar asociaciones entre resultados, identificando las posibles causas del efecto.³⁰

4.2. Universo y Muestra

La población estuvo constituida por cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Muestra: La muestra estuvo constituida por un total de 13 repeticiones por grupo experimental

Para determinar el tamaño muestral se aplicó la siguiente formula:

$$n = 2 \left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (DE)^2 / d^2$$

Dónde:

n: tamaño de muestra para el grupo de estudio.

α : probabilidad de cometer error tipo I.

β : probabilidad de cometer error tipo II.

Z: valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: desviación estándar.

d: diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 99% ($\alpha=0.05$, $Z=1.96$), y una potencia en la prueba del 80% ($\beta=0.20$, $Z=0.84$), para ($DE/d=0.90$).

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2(0.9)^2$$

$$n = 13$$

Se realizó 13 repeticiones por grupo experimental ³¹

4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DIMENSIÓN	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES Y CATEGORIAS	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN
variable independiente Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	No aplica	Es una sustancia biosintetizada de <i>Origanum vulgare</i> con aroma peculiar e insoluble al agua. ²⁵	Sustancia biosintetizada de <i>Origanum vulgare</i> en distintas concentraciones con la capacidad de producir un efecto antibacteriano	Concentración del aceite	10% 25% 50%	Cualitativo	Ordinal
Variable dependiente Efecto antibacteriano sobre s. mutans ATCC25175	Sensibilidad bacteriana	Reacción bacteriana frente a un antibiótico o compuesto químico. ³²	Prueba de difusión en discos de Kirby Bauer	Halo de inhibición	mm	Cuantitativo	De razón

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica empleada fue la observación microbiológica y el instrumento para medir los halos de inhibición fue una regla de precisión milimétrica vogel con DIN/ISO 866/I y es válido dado que mide la longitud y su calibración es confiable.

Para la ejecución el personal capacitado firmó una constancia de asesoramiento al investigador (ver anexo 1)

Para registrar los resultados se utilizó una ficha de recolección de datos (Ver anexo 2)

4.4.1. De la obtención e identificación taxonómica *Origanum vulgare*:

14 Kg de la planta de *Origanum vulgare* “Orégano” fueron recolectados del distrito de Allacday provincia de Otuzco, del departamento de La Libertad, ubicado a 3300 m.s.n.m.

Un ejemplar completo de la planta fue llevado al Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo, para su identificación y posterior verificación taxonómica. (Ver anexo 3)

4.4.2. De la preparación de *Origanum vulgare*

a. Selección

La planta fue transportada al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se eliminaron las sustancias extrañas presentes en la muestra.³³

b. Lavado

Luego de la separación de las sustancias extrañas, se procedió a lavar la planta entera (hojas y tallo) con agua destilada, seguido de una desinfección utilizando hipoclorito de sodio, a una concentración de 200 ppm.³³

c. Secado

Se colocó la planta entera (hojas y ramas) sobre papel kraft y se puso a secar en una estufa con circulación de aire por convección forzada, luego se separó las hojas de los tallos.³³

4.4.3. De la obtención del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”

Para la obtención del aceite se siguió los protocolos de Gonzales y Miranda empleando el método de “destilación por arrastre de vapor de agua”.^{33 34}

Se pesó 1 kg de hojas, previamente desecadas a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio; así como 3 L de agua destilada en un recipiente de acero inoxidable de 5 L. Luego se armó el equipo de destilación, sometiendo la muestra a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, arrastrando la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, fue condensada. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, para lo cual se utilizó una pera de separación de vidrio, deshidratándose las impurezas de agua en el aceite esencial con Na₂SO₄ anhidro. Finalmente se filtró, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar (para evitar la descomposición por la luz) y bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C.

4.4.4. De la obtención de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”

Para la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* éste fue transformado de porcentaje (%) a mg/mL, teniendo en cuenta la densidad de aceite esencial de orégano (0.923 g/mL)

Volumen de aceite	Volumen de Tween 80	Volumen Final	Concentración (%)
1 mL	9 mL	10 mL	10
2.5 mL	7.5 mL	10 mL	25
5 mL	5 mL	10 mL	50

Luego, se colocaron cada una de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar, para protegerlas de la luz, llevándolas posteriormente a refrigeración a 4 °C, hasta la realización del análisis microbiológico.³⁴

4.4.5. De la obtención de *Streptococcus mutans*.

Las cepas liofilizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fueron obtenidas directamente del laboratorio Gen Lab. (Ver anexo 4)

4.4.6. Reactivación de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175.

La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, luego se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia.³⁴

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar TSYB e incubó en 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración gram.

La cepa se mantuvo en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), hasta su posterior utilización.³⁴

4.4.7. De la determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Para la evaluación del efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se realizó mediante el método Kirby Bauer de difusión en agar.³⁴

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

a) Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175.

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mantenidos en Caldo BHI se sembró en Agar TSA, se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 48 horas. Luego de 24 horas cada colonia de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se diluyó en caldo BHI hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 ufc/mL)³⁴

b) Inoculación de las placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocaron en las placas con Agar Müller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en

la placa. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.³⁴

c) Preparación de los discos con las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare*

Se prepararon discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con 30 ul de cada uno de las concentraciones 10%, 25% y 50%, y como control positivo Digluconato de clorhexidina al 0.12% y control negativo Tween 80

Luego, con una pinza estéril, los discos fueron colocados sobre las placas de Petri con Müeller Hinton sembradas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Se realizaron 13 repeticiones.³⁴

d) Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las concentraciones a evaluar. Se incubaron a 37°C durante 48 horas en microanaerobiosis utilizando jarra Gaspak y con el método de la vela.³⁴

e) Lectura de los resultados:

Después de un tiempo de incubación de 48 horas se examinó cada placa, se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano para lo cual se utilizó una regla de precisión milimétrica vogel con DIN/ISO 866/I

4.5. Plan de análisis

Los datos recolectados fueron incorporados en una base de datos en IBM SPSS Statistics 22, para ser procesados y presentados en tablas con medias y desviaciones estándar.

La solución del aceite esencial fue comparada con el control positivo y negativo. Para el efecto antibacteriano en las colonias de *Streptococcus mutans* se empleó la prueba de ANOVA previo análisis de la normalidad de distribución de los valores y test de Tukey para comparación de medias. La significancia estadística fue considerada si $p < 0.05$.

4.6. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	METODOLOGIA	POBLACION
<p>Problema general:</p> <p>¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del <i>Origanum vulgare</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?</p>	<p>Objetivo general:</p> <p>Comparar in vitro el efecto antibacteriano del aceite esencial del <i>Origanum vulgare</i> en las concentraciones 10%; 25% y 50% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Objetivo específico:</p> <p>Evaluar in vitro el efecto antibacteriano del aceite esencial del <i>Origanum vulgare</i> al 10% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Evaluar in vitro el efecto antibacteriano del aceite esencial del <i>Origanum vulgare</i> al 25% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Evaluar in vitro el efecto antibacteriano del aceite esencial del <i>Origanum vulgare</i> al 50% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p>	<p>El aceite al 50 % tiene mayor efecto antibacteriano in vitro que las concentraciones 10% y 25% de aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Es una investigación de tipo cuantitativo</p> <p>Nivel de investigación</p> <p>Es una investigación de nivel explicativo</p> <p>Diseño de la investigación</p> <p>Experimental, prospectivo, transversal y analítico</p>	<p>Población: Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Muestra: 13 repeticiones por grupo experimental</p>

	<p>Comparar el efecto del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> con digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Comparar el efecto del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> con Tween 80 sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p>			
--	---	--	--	--

Principios éticos

El presente estudio de investigación es un estudio in vitro que se realizó en cepas de *S. mutans*, se sometió a los principios éticos consignados en el código de Ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote ULADECH.

IVI. Resultados

5.1.Resultados

Tabla 1. Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare* de Otuzco sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175”.

Concentració <i>n</i>	N	Efecto antibacteriano (Halo=mm)		Intervalo de confianza para la media al 95%		p*
		Media	Desviació n típica	Límite inferior	Límite superior	
10%	13	12.15	1.390	11.30	13.00	
25%	13	16.38	2.142	15.09	17.68	
50%	13	20.00	1.683	18.98	21.02	0.000
C+	13	10.15	1.068	9.51	10.80	
C-	13	0.00	0.00	0.00	0.00	

p*: prueba ANOVA

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

Se comparó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* a las concentraciones de 10%, 25%, 50%, C+, C-, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se determinó una media 12.15mm para la concentración 10%, una media 16.38mm a la concentración 25%, una media 20.00mm a la concentración 50%, así mismo una media 10.15mm al C+, una media 0.00mm al C- , Se utilizó la prueba ANOVA y se obtuvo $p=0.000$, lo cual indica que si existe diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones y los controles.

Tabla 2 Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* en concentraciones de 10%, 25%, 50% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Comparaciones múltiples

(I) Concentracion	(J) Concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
HSD de Tukey	10%	25%	-4.231	0.569	0.000	-5.83	-2.63
		50%	-7.846	0.569	0.000	-9.45	-6.24
		C+	2.00	0.569	0.007	0.40	3.60
		C-	12.154	0.569	0.000	10.55	13.76
	25%	10%	4.231	0.569	0.000	2.63	5.83
		50%	-3.615	0.569	0.000	-5.22	-2.01
		C+	6.231	0.569	0.000	4.63	7.83
		C-	16.385	0.569	0.000	14.78	17.99
	50%	10%	7.846	0.569	0.000	6.24	9.45
		25%	3.615	0.569	0.000	2.01	5.22
		C+	9.846	0.569	0.000	8.24	11.45
		C-	20.000	0.569	0.000	18.40	21.60
	C+	10%	-2.000	0.569	0.007	-3.60	-0.40
		25%	-6.231	0.569	0.000	-7.83	-4.63
		50%	-9.846	0.569	0.000	-11.45	-8.24
		C-	10.154	0.569	0.000	8.55	11.76
	C-	10%	-12.154	0.569	0.000	-13.76	-10.55
		25%	-16.385	0.569	0.000	-17.99	-14.78
		50%	-20.000	0.569	0.000	-21.60	-18.40
		C+	-10.154	0.569	0.000	-11.76	-8.55

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

Se puede apreciar en la prueba de Turkey que las tres concentraciones y los dos controles presentan nivel de significancia menor a 0.05, los cuales al parecer si presentar una diferencia estadísticamente significativa.

5.2. Análisis de resultados

Los resultados del presente estudio mostraron que el aceite esencial *Origanum vulgare* posee un efecto antimicrobiano debido a su capacidad de inhibir la bacteria *S mutans*; esto confirma los resultados del estudio realizado por Albado et al.⁹ quienes estudiaron la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* en bacterias tanto del tipo gram positivo como gram negativo obteniendo que el aceite esencial de *Origanum vulgare* tiene la capacidad de inhibir bacterias de ambos tipos, al igual que el estudio realizado por Morillas⁴ quien mostró el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Origanum vulgare* contra cepas de *Salmonella typhi* logrando inhibirlas. Estos resultados nos indican el alto potencial del aceite esencial *Origanum vulgare* como antimicrobiano.

Este estudio muestra también la clara capacidad del aceite esencial *Origanum vulgare* para inhibir *S mutans*; hallazgos que son respaldados también por los estudios realizados tanto por Busatta et. al.⁸ como por Abdul et. al.⁵ quienes demostraron la efectividad antimicrobiana de *Origanum vulgare* en aceite esencial y extracto sobre cepas de *S. mutans*. Este efecto antibacteriano de *Origanum vulgare* contra *S mutans* puede deberse a los elementos que posee tales como flavonoides, fenoles, terpenos, hidrocarburos, etc, los cuales pueden estar causando la sensibilidad bacteriana en *S. mutans*.^{18, 23, 24, 25}

Los resultados del presente estudio demuestran la efectividad del aceite esencial *Origanum vulgare* en diferentes concentraciones (10%; 25% y 50%) presentando todas un efecto antibacteriano sobre *S mutans* (tabla1), siendo el 50% la concentración con mayor efectividad bacteriana, presentando un halo de inhibición de hasta 20 mm, seguidamente la concentración de 25% y 10%, que presentaron

halos de inhibición de 16, 38 mm y 12,15 mm respectivamente; mostrando que a mayor concentración mayor efecto antibacteriano al igual que el estudio realizado por Maraví⁶ et. al. quien obtuvo un mejor resultado con el aceite esencial *Origanum vulgare* al 100% formando un halo de 25.72 mm seguido de la concentración de 50% que mostro un halo de 8.53 mm; dando esto una evidente relación entre concentración y efecto antibacteriano.

Sin embargo el estudio realizado por Maravi et al ⁶, demostró la efectividad de *Origanum vulgare* sobre *S mutans* al 50% pero con halos de inhibición con un promedio de 8, 53 mm, resultado que difiere con este estudio, ya que nuestro aceite esencial de *Origanum vulgare* al 50 % aplicado sobre *S. mutans* logro obtener un halo con promedio de hasta 20 mm, dicha diferencia en el resultado podría deberse a la técnica de dilución de las diversas concentraciones, ya que Maravi et al. ⁶ utilizó en su estudio como diluyente de su aceite esencial, agua destilada y dimetilsulfoxido y en este estudio se empleó tween de 80.

De igual manera Baca et. al.³ realizó un estudio evaluando la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% frente a cepas de *S. mutans*, el cual demostró un halo de inhibición de tan solo 15, 889 mm. Estos resultados pueden haber variado debido al distinto lugar de origen, época de cosecha, método de recolección o técnica empleada para la elaboración de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* en los diferentes estudios.²⁷

Es necesario también resaltar que el aceite esencial de *Origanum vulgare* podría obtener un efecto sinérgico al momento de acompañar otras sustancias, este antecedente lo marcó Chávez et al.⁵ En su estudio donde buscó encontrar un efecto sinérgico de *Origanum vulgare* y *gentamicina* demostrando que la combinación de

estos dan un halo de inhibición de 22,375 mm y la *gentamicina* sola un halo de 20,75 mm. Esto demuestra que *Origanum vulgare* no solo puede servir como un agente antimicrobiano sino también puede servir como complemento para sinergizar el efecto de otros agentes antimicrobianos.

Se comparó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* en concentraciones de 10%, 25% y 50%, con Digluconato de clorhexidina al 0.12 % y Tween 80, como control positivo y negativo respectivamente. Se observó que estas concentraciones presentan diferencia estadística significativa con digluconato de clorhexidina y tween 80, lo cual podría deberse a los diversos componentes que posee el aceite esencial de *Origanum vulgare* tales como, flavonoides, fenoles, terpenos, timol, carvacol, etc, demostrando así un efecto notablemente mayor a los controles positivos y negativos.^{18, 23, 24,25}

VI. Conclusión

- El aceite esencial del *Origanum vulgare* al 10%, 25% y 50% poseen un efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- El aceite esencial del *Origanum vulgare* posee mayor efecto antibacteriano al 50% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación con las concentraciones de 10% y 25%
- El aceite esencial del *Origanum vulgare* al 10%, 25% y 50% presentó un mayor efecto antibacteriano que el digluconato de clorhexidina al 0.12% y tween 80 sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Aspectos complementarios

Se recomienda realizar más estudios que comparen el aceite esencial de *Origanum vulgare* en más concentraciones; asimismo que comparen el aceite esencial de *Origanum vulgare* de distintas zonas de Perú y en distintas estaciones con la finalidad de identificar la mejor zona y estación para la recolección del mismo.

Se recomienda hacer estudios donde se evalué el efecto sinérgico con aceites de otras plantas, así mismo determinar la CMI y CMB.

VII. Referencias bibliográficas

1. Pérez J, Duque de Estrada J, Hidalgo I. Asociación del Estreptococos mutans y lactobacilos con la caries dental en niños. Rev. Cubana Estomatológica. [serie en internet]. 2007; 44(4): 1-13. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000400002
2. Melnik J, Adelberg E, Jawest E. Manual de Microbiología Médica. 3ra edición. Editorial Pueblo y Educación. 1968. pp 291
3. Baca AM, Yábar FA, Mendoza AM. Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: Foeniculum Vulgare (Hinojo), Cimbopogon Citrus (Hierba Luisa), Origanum Vulgare (Orégano), Citrus Aurantifolia Swingle (Limón) Y Citrus Sinesis (Naranja), frente a cepas estandarizadas de Streptococcus mutans. [Tesis para optar el título de cirujano dentista] Cusco. Repositorio de la Universidad Andina del Cusco. Disponible en: <http://repositorio.uandina.edu.pe/handle/UAC/559>
4. Morillas TI. Efecto in vitro del aceite de Origanum vulgare sobre Salmonella typhi. [Tesis para optar el título de cirujano dentista] Trujillo. Repositorio de la Universidad Privada Antenor Orrego 2015. Disponible en: https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=http%3A%2F%2Frepositorio.upao.edu.pe%2Fbitstream%2Fupaorep%2F1583%2F1%2FMorillas_Terrones_Origanum_Vulgare_Salmonella.doc
5. Abdul S, B, Hassan A, Hassan A. In vitro antimicrobial Activity of Thymus Vulgaris, Origanum Vulgare and Rosmarinus officinalis against dental caries pathogens. Ibn Al- Haitham Journal for pure and applied Science [serie de

- internet] 2012 [citado el 21 de Enero de 2019]; 25 (2) .Disponible en:
<https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=61029>
6. Maraví G, Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de Menta Piperita (Menta), Origanum Vulgare (Orégano) Y Cymbopogon Citratus (Hierba Luisa) sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Cándida albicans ATCC 90028. [Tesis de cirujano dentista]. Lima. Universidad Privada Norbert Wiener. 2012. Disponible en:
<http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/48>
 7. Chavez L, Diaz F, Escalante G, Estrada E. Efecto sinérgico del aceite esencial de Origanum vulgare a la Gentamicina en cultivos de Echerichia coli. [serie en internet] 2008 [citado 21 de Enero del 2019] 13(2): 45-48. Disponible en :
<http://www.cimel.felsocem.net/index.php/CIMEL/article/view/146/pdf>
 8. Busatta C, Mossi, A, Cansian, R, Alves M, Evaluation Of Origanum Vulgare Essential Oil As Antimicrobial Agent In Sausage. Brazilian Journal of Microbiology.[serie en internet] 2007[citado el 21 de Enero de 2019]; 38 (4): 610-616. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/230816863_Evaluation_of_Origanum_vulgare_essential_oil_as_antimicrobial_agent_in_sausage
 9. Albado E, Saez G, Grabiél S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered. [serie en internet] 2001 [21 de enero del 2019] 12 (1): 16 – 19. Disponible en:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3.pdf>
 10. Programa Nacional de Atención Estomatología Integral a la población. C. Habana, Cuba, 2002

11. Gonzalo P. Historia natural y factores de la caries. Elsevier. España. 2000. 4(1): 15- 19
12. Aliviano D, Aliviano C. Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. [serie en internet] 2009, Jan. [citado el 21 de Enero de 2019] 10: 106-121. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149593>
13. Atsumi, T., Fujisawa, S., Tonosaki, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. Toxicology in Vitro [Serie en internet] 2005; [citado el 21 de Enero de 2019]; 19(8): 1025-1033. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088723330500072X?via%3Dihub>
14. Liébana J. Microbiología Oral. 2ed. Madrid: McGraw - Hill. Interamericana de España; 2002.
15. Aricapa D, Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. [Tesis doctoral]. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana: Repositorio de la Universidad Javeriana. 2016. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf>
16. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. An Fac Med [serie en internet]. 2001; [citado el 21 de Enero de 2019] 62 (2): 156-161. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/379/37962208.pdf>
17. Romero M, Hernández Y, Gil M, Actividad inhibitoria de la matricaria recutita "manzanilla alemana" sobre el Streptococcus mutans. Rev Latinoamericana de

- Ortodoncia y Odontopediatría. [serie en internet] 2009. [citado el 21 de Enero de 2019]. Disponible en: <https://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art-1/#>
18. Gómez CC. Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche – Imbarura, sobre *Streptococcus mutans*, *klebsiella pneumoniae*, *Cándida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas [Tesis para optar el título de Ingeniera de biotecnologías] Sangolqui. Escuela Politecnica del Ejército. 2010. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/586/T-ESPE-029608.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
19. Tonguino MI. Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de dos plantas aromáticas: Menta (*Mentha piperita* L) y Orégano (*Origanum vulgare* (L)). [Tesis de Ingeniero Agroindustrial]. Ecuador. Universidad Técnica del Norte. 2011. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/385/1/03%20AGI%20273%20TESIS.pdf>
20. Elicriso [página en internet] España: Publicaciones Elicriso [Citado el 05octubre 2011] Disponible en: http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/oregano/
21. Del Pozo EX. Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon Citratus* (DC) stapf). [Tesis Ingeniero en Biotecnología]. Ecuador. Repositorio

- Dspce. 2006. Disponible en:
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/511>
22. Arcila C, Loarca G, Lecona S, González E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes Archivos Latinoamericanos de Nutrición [serie en internet] 2004, Marzo [citado el 21 de Enero de 2019] 54(1): 100-111. Disponible: <https://www.scienceopen.com/document?vid=af0772eb-2b4f-42e2-bfd3-e692035fbe4a>
23. Hammer K, Carson C, Riley T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology [serie en internet] 1999, Feb [citado el 21 de enero del 2018]; 86: 985-990. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
24. Henostroza G. Diagnóstico de caries dental. 2 ed. Lima: UPCH;2005.
25. De Figueiredo L. Odontología para el bebé. Sao Paulo: Editora Artes Médicas; 2000.
26. Cosco RD. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla. [Tesis, para optar al título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2149>
27. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. [Tesis para optar el título de Ingeniera Química]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandregonzalezvilla.2004.pdf>

28. Dorland Diccionario Médico Ilustrado. 26^a ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2003. caries dental; etiología, placa bacteriana; p. 129, 307, 641.
29. Gomez A. Lopez A. potencial antimicrobiano de aceites esenciales de orégano (*origanum vulgare*) y canela (*cinnamomum zeylanicum*). Temas selectos de ingeniiería de alimentos. [serie en internet] 2009 [citado el 21 de Enero del 2018]; 3(1): 33-45. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Gomez-Sanchez-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Gomez-Sanchez-et-al-2009.pdf)
30. Hernandez R, Fernandez C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5 ed. Mexico. McGraw-Hill-Interamericana. Editores. 2010
31. Montgomery D. Diseño y análisis de experimentos. 2ed. México. Editorial Limusa SA. de CV. Grupo Noriega editores. 1995
32. Bastos M, Damé L, De Souza L, Almeida D, Alves M, Braga J. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Rev Cubana Plant Med.[serie en internet] 2011, Set [citado el 21 de Enero de 2019]; 16(3): 260-266. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300006
33. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos Universidad de la Habana [serie en internet] 2002 [citado el 21 de Enero de 2019]; 2-66. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/125194922/METODOS-D>
34. Panreac Química S.A. Manual Básico de Microbiología. 4 ed. Barcelona: Cultimed; 2003.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Trujillo, 16 de enero del 2017

CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727 y acreditada como Docente Investigadora por CONCYTEC con número de registro REGINA: N°1582.

Dejo constancia de haber asesorado al alumno **JEAN JAVIER VILCA VARGAS** en las actividades de recolección del material vegetal, preparación de la muestra, extracción de aceite esencial y preparación de las concentraciones de ensayo, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas, serán utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada: "Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175".

Atentamente,




Dra. **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo **MANUELA LUJÁN VELASQUEZ**, docente de la cátedra de inmunología del departamento académico de Microbiología y Paratología de la facultad de la universidad nacional de Trujillo, con código UNT 4546

Dejo constancia de estar asesorando al alumno **JEAN JAVIER VILCA VARGAS**, en la parte microbiológica, en el laboratorio de Inmunología de la universidad nacional de Trujillo con la tesis "*Origanum vulgare* sobre *Streptococcus mutans* ATCC25175".

Atentamente,

MANUELA LUJÁN VELASQUEZ

Docente de inmunología

Departamento de microbiología

ANEXO 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha de recolección de datos, medición de halos de inhibición de <i>Origanum vulgare</i> (oregano) frente a los <i>streptococcus mutans</i> ATCC25175					
ENSAYO	Halo de inhibición (mm)				
	10 %	25%	50%	Control +	Control -
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					

ANEXO 3:

DESGLOSABLE
Apellidos y Nombres: Vilca Vargas Juan Javier DNI 32314693
Objeto de la Solicitud: (Indicar en forma clara lo que solicita y detallar documentos que adjunta)
Determinación taxonómica de una planta
Familia: LAMIACEAE
N.C.: Origanum vulgare L.

N° Procedimiento del TUPA: 142
Recibo Coya N° 05-150-1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD U OFICINA Herbario HWT
FECHA 10/01/2017 HORA 9:39am
RECEPCIONISTA: Eric F. Rodriguez R.
AUTOMATICO S.A. (+) S.A. (-)
PLAZO ATENCIÓN (Según TUPA) 07
REGISTRO _____ FIRMA _____

DISTRIBUCIÓN GRATUITA



Determinación taxonómica de la planta

ANEXO 4

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-23 Reference Number: ATCC® 25175™ [†] Purity: > 99.9% of Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 3		Expiration Date: 2018/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2016/12/8	
Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.		Performance Medium: SBAP	
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominantly in chains		Method: Gram Stain (1)	
ID System: Vitek GP (1) See attached ID System results document.		Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative	
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE			
<small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>			
<small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>			
<small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small>			
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>			
		<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>	
		<small>(†) These tests are accredited to ISMEC 17025:2005</small>	
<small>TESTING CERT #2655.01</small>			

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.266

Certificación de Streptococcus mutans ATCC25175

ANEXO 5

VALORES OBTENIDOS DE LA MEDICIÓN DE HALOS DE CADA CONCENTRACIÓN

Valores obtenidos de la medición de halos de cada Concentración				
Aceite de orégano al 10%	Aceite de orégano al 25%	Aceite de orégano al 50%	C+	C-
14mm	17 mm	21 mm	11mm	0mm
13mm	20 mm	23 mm	9 mm	0mm
10 mm	17 mm	21 mm	10 mm	0mm
13 mm	15 mm	19 mm	12 mm	0mm
14 mm	16 mm	20 mm	9 mm	0mm
11 mm	18 mm	20 mm	10 mm	0mm
13 mm	14 mm	18 mm	9 mm	0mm
12 mm	18 mm	18 mm	10 mm	0mm
13 mm	20 mm	20 mm	11 mm	0mm
11 mm	15 mm	19 mm	9 mm	0mm
13 mm	14 mm	20 mm	10 mm	0mm
10 mm	15 mm	23 mm	12 mm	0mm
11 mm	14 mm	18 mm	10 mm	0mm

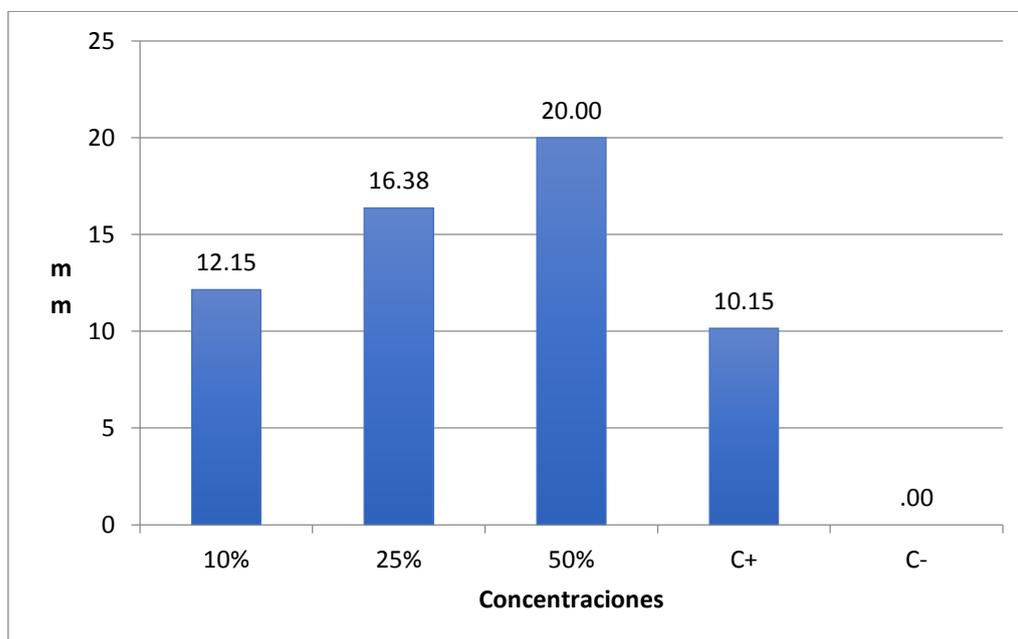
PRUEBA DE NORMALIDAD

Grupos	Shapiro-Wilk			Distribución Normal
	Estadístico	gl	Sig.	
10%	0,882	13	0,076	Normalidad
25%	0,894	13	0,109	Normalidad
50%	0,895	13	0,115	Normalidad
C+	0,859	13	0.037	No Normalidad

- Ya que los datos obtenidos en (C-) son una constante, se ha desestimado.

Al tener menos de 50 datos por cada concentración, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la distribución normal de los datos, de donde se puede observar que los valores obtenidos en 10%, 25%, 50%, con una significancia mayor a 0.05 (Sig. >0.05), Con lo cual podemos concluir que los datos si presentan un distribución normal, mientras que para el control positivos con una significancia menor a 0.05 (Sig. < 0.05), lo que indica la normalidad. En general se puede indicar que los datos son normales.

ANEXO 6:



Fuente: Datos proporcionados por el investigador

GRAFICO 1: *Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones y los controles positivo y negativo del aceite esencial de Origanum vulgare de Otuzco sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175”.*

Fotos durante la ejecución



Chacra de Origanum vulgare (orégano)

Allacday caserío de Otuzco distrito Otuzco departamento la libertad

Ubicado a una hora de otuzco altura 3300m.s.n.m



Cosecha de Origanum vulgare (orégano)



Lavado y desinfección con hipoclorito de sodio más agua destilada



Llevamos el orégano pre secado a la estufa por 24 horas a 40°C



Pesando obtención final de orégano libre de tallo



El orégano es colocado en un destilador de arrastre por vapor de agua por 1 hora



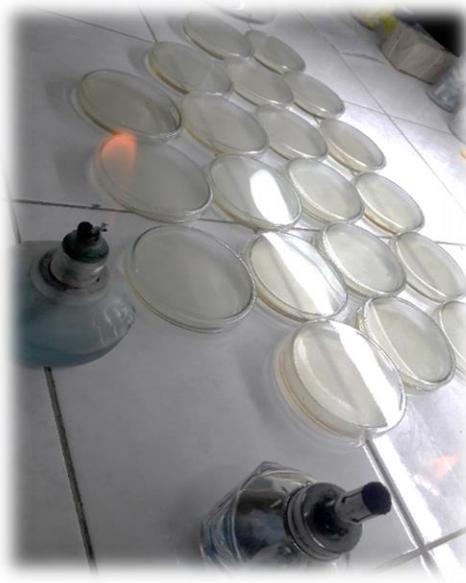
Sellamos y esperamos el proceso de evaporación



Una hora después del del proceso de destilado por vapor obtención de aceite esencial concentración al 100 % (puro)



Dilución de concentraciones de aceite esencial más tween 10%, 25%, 50%,



Placas con agar miuller Hilton



Agregamos 15 ul de aceite esencial diluido a cada disco 13, repeticiones por cada concentración



Se dejó en microaerofilia por 48horas

Lectura de resultados y medición de halos de inhibición

