

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ENJUAGUE BUCAL A BASE DE *Lippia
origanoides* y *Mentha piperita* FRENTE A LA FLORA ORAL DE
ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA.**



KAREN FRANCO VALENCIA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Magister en Microbiología**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE POSGRADO DE MEDICINA
CARTAGENA DE INDIAS D.T Y C**

2013

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ENJUAGUE BUCAL A BASE DE *Lippia
origanoides* y *Mentha piperita* FRENTE A LA FLORA ORAL DE
ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA.**



KAREN FRANCO VALENCIA

**Prof. JESÚS OLIVERO VERBEL. Ph.D.
Director**

**Prof. BÁRBARA ARROYO SALGADO MSc.
Co-Directora**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Magister en Microbiología**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE POSGRADO DE MEDICINA
CARTAGENA DE INDIAS D.T Y C
2013.**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1 MARCO TEÓRICO.....	16
1.1 Comunidades bacterianas y biopelícula oral	16
1.2 Caries dental.....	18
1.3 Terapia antimicrobiana utilizada en la biopelícula.....	21
1.4 Enjuagues bucales.....	22
1.5 Aceites esenciales y sus propiedades antimicrobianas	22
1.5.1 Efectos biológicos de los aceites esenciales.	29
1.5.2 Métodos para determinar genotoxicidad, toxicidad de las plantas y sus productos naturales.	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo general.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 METODOLOGÍA.....	34
3.1 Etapa I. Evaluación <i>in vitro</i> de la toxicidad del aceite esencial de Lippia organoides en células HepG2.....	35
3.2 Etapa II. Preparación y valoración del enjuague bucal	39
3.3 Etapa III. Actividad antimicrobiana del enjuague bucal natural.	41
3.4 Etapa V. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	43
3.5 Etapa V. Análisis estadístico.....	45
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1 Etapa I. Evaluación <i>in vitro</i> de la toxicidad del aceite esencial Lippia organoides en células HepG2.....	46
4.1.1 Pruebas de Genotoxicidad.....	48

4.2 Etapa II. Preparación y valoración del enjuague bucal.	50
4.3 Etapa III. Actividad antimicrobiana del enjuague bucal natural.	54
4.4 Etapa IV. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	59
5 CONCLUSIONES.....	67
6 BIBLIOGRAFÍA	68
7 ANEXOS	88

Nota de aceptación

Nombre y firma del presidente del jurado

Nombre y firma del jurado

Nombre y firma del jurado

Nombre y firma del Jefe de la Unidad Académica

Cartagena, 15 de noviembre del 2013

RESUMEN

La mucosa humana presenta diversas comunidades microbianas y ha sido estimado que más de 700 diferentes especies microbianas, son capaces de habitar en medio de interacciones sinérgicas, mutualistas y antagónicas entre los diferentes microorganismos, contribuyendo así al desarrollo y acumulación de comunidades polimicrobianas que forman una biopelícula denominada placa dental.

Cuando el equilibrio microbiano es afectado, suceden en la biopelícula alteraciones que conllevan a enfermedades tales como la gingivitis, la periodontitis y la caries, las cuales afectan un gran número de personas. La caries dental es una enfermedad microbiana que sigue constituyendo un problema de salud en todo el mundo, afectando mayoritariamente a la población adulta y escolar entre el 60% y 90% según la OMS en el 2007. Por lo tanto, dentro del amplio espectro de bacterias de la microbiota oral, el género *Streptococcus* spp. es el más importante y prevalente, siendo la especie *mutans* el principal agente etiológico relacionado con la caries.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal natural a base de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Mentha piperita* evaluando su aceptación organoléptica en un grupo de donantes voluntarios, analizando su citotoxicidad (ensayo MTT) y genotoxicidad (ensayo cometa) en cultivos *in vitro* de células HepG2 y evaluando su acción microbiológica. Posteriormente, fue evaluada la actividad antimicrobiana y comparada con un enjuague bucal comercial, además de valorar de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a cepas ATCC de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*.

El enjuague bucal presentó una efectiva aceptación organoléptica. Los resultados obtenidos en la citotoxicidad (ensayo MTT) demuestran que a bajas y altas concentraciones las células HepG2 pueden tolerar el aceite, para el caso de la genotoxicidad (ensayo cometa) las concentraciones más bajas sugieren una baja sensibilidad de las células HepG₂ a *L. organoides*. El enjuague bucal natural presenta actividad antibacteriana en las concentraciones de 5% y 10%. El método utilizado para valorar la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue el de microdilución en caldo con placas de 96 pozos. Las cepas de *S. mutans* y *S. aureus* tuvieron un grado de inhibición a concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL y 150 mg/ mL, a diferencia de las cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, en las que no hubo actividad inhibitoria.

Recientemente un gran número de aceites esenciales y sus componentes han sido investigados por su actividad biológica, en particular por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, generando un creciente interés debido a su gran aceptación por los consumidores y sus múltiples usos. Entre sus cualidades más importantes está, que son capaces de penetrar en la placa dental, ejerciendo un efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de bacterias en la biopelícula con la reducción de la carga bacteriana, la maduración de la biopelícula y la patogenicidad.

Palabras claves: Aceites esenciales, *Mentha piperita*, *Lippia organoides*, actividad antimicrobiana.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de algunos aceites esenciales extraídos de plantas Colombianas.....	26
Tabla 2. Clasificación de los diferentes niveles de daño al ADN	38
Tabla 3. Pruebas microbiológicas del enjuague bucal natural	53
Tabla 4. Interpretación de resultados de frecuencia de consumo de carbohidratos vs antecedentes de enfermedades orales en los estudiantes de la Universidad de Cartagena.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de <i>Lippia origanoides</i> "Orégano de monte" y <i>Mentha piperita</i> "menta"	29
Figura 2. Ensayo MTT.	31
Figura 3. Procedimiento realizado para la evaluación del ensayo cometa	32
Figura 4. Procedimiento general para la valoración del enjuague bucal natural (CENIVAM, 2012).....	34
Figura 5. Procedimiento general de los análisis microbiológicos del enjuague bucal natural.....	34
Figura 6. Procedimiento realizado para la evaluación del ensayo MTT.	36
Figura 7. Metodología y fundamento del ensayo cometa (Burlinson, 2012) para evaluar la genotoxicidad del aceite esencial <i>L. origanoides</i> , un componente del enjuague bucal 100% natural.	38
Figura 8. Resultados del ensayo de MTT para células HepG2 expuestas al aceite esencial de <i>L. origanoides</i> . Los valores son expresados como la media de al menos 3 experimentos independientes.....	47
Figura 9. Resultados del ensayo cometa en las células HepG2 tratadas y controles. A) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 0 y 1; B) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 2; C) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 3; D) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 4	50

Figura 10. Descripción de la evaluación organoléptica en puntajes para cada uno de los atributos evaluados para el enjuague bucal natural. A. Color, B. Olor, C. Sabor, D. Sensación de aliento refrescante. 52

Figura 11. Representación gráfica del recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) después del tratamiento de la saliva en las concentraciones de 10%, 5% del enjuague bucal y 5% del enjuague bucal comercial. *. Diferencias significativas ($p < 0.05$) comparadas con el control negativo 0% 59

Figura 12. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *S. aureus* ATCC 25923, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/ mL), inoculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton. 61

Figura 13. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *S. mutans* ATCC 25175, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/ mL), inoculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton 62

Figura 14. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *K. pneumoniae* ATCC 13883, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/ mL), inoculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton 64

Figura 15. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/ mL), inoculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton..... 65

ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE ENCUESTA PARA RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA.	88
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PARTICIPANTES DEL PROYECTO.	89
ANEXO 3. MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS.....	90
ANEXO 4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ENJUAGUE BUCAL NATURAL FRENTE ALTRATAMIENTO DE LA SALIVA	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

UFC: Unidad formadora de colonia

MIC: Concentración mínima inhibitoria

mL: Mililitro

nm: Nanómetro

µL: Microlitro

OMS: Organización mundial de la salud

Gtfs: Glucosiltransferasas

RAT: Respuesta ácido tolerante

MTT: Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico

ADN: Ácido desoxirribonucleíco

DMSO: Dimetilsulfóxido

NaCl: Cloruro de sodio

µg: Microgramo

LB: Luria Bertani

FDA: Food and Drug Administration

INTRODUCCIÓN

La formación de las biopelículas son la causa primaria de las enfermedades infecciosas en la boca, entre ellas se destaca la caries dental, la cual es el resultado de la interacción de bacterias específicas y sus productos metabólicos con elementos salivales y carbohidratos de la dieta que se producen en la superficie dental susceptible, por medio de la formación de una matriz rica en polisacáridos extracelulares, acidificación del medio y el mantenimiento de un pH bajo en la interfase del diente-biopelícula, jugando así *Streptococcus mutans* un papel clave en el desarrollo de la placa dental (Jeon et al., 2011).

Por otra parte, la clave para la prevención y tratamiento de enfermedades orales radica en el control efectivo de la formación de la biopelícula, razón por la que muchos estudios han intentado la identificación de un agente antimicrobiano eficaz con características favorables, tales como la seguridad, el bajo costo y la alta efectividad (Lobo et al., 2011). Por lo tanto, un sin número de agentes químicos presentes en los enjuagues bucales utilizados, son eficaces para la eliminación de las biopelículas, pero con la desventaja de ser abrasivos, creando microporosidades en las superficies de la dentadura, y de esta manera la colonización de los microorganismos (André et al., 2011).

Estos efectos no deseados, derivados del uso regular han traído varias desventajas, las cuales no han sido comúnmente observadas en los enjuagues

bucales que contienen aceites esenciales (Rasooli et al., 2008). En este sentido, algunos productos naturales que se originan en las plantas pueden influir en la formación de biopelículas microbianas, mediante compuestos de origen vegetal que inhiben la síntesis de péptidoglucano, daños en las estructuras de la membrana microbiana y la modulación del quórum, contribuyendo de esta manera con la reducción de la biopelícula (Rasooli et al., 2008).

Por lo anterior, el uso de productos naturales se ha convertido en una fuente importante de agentes terapéuticos innovadores y eficaces a lo largo de la historia humana, ofreciendo una amplia gama de moléculas bioactivas estructuralmente conocidas (Jeon et al., 2011). La mayoría de estas moléculas son derivadas de metabolitos secundarios de origen vegetal, las cuales sirven como mecanismo de defensa contra los microorganismos, insectos y herbívoros (Cowan, 1999; Rasooli et al., 2008; Jeon et al., 2011).

Finalmente, los efectos secundarios asociados con el uso de estos agentes han estimulado la búsqueda de alternativas para el control de la biopelícula oral (Harini y Anegundi, 2010). El interés en la alternativa de enjuagues bucales compuestos de sustancias naturales como los aceites esenciales que contienen mentol y timol pueden contribuir en las propiedades antisépticas de estos productos (Yigit et al., 2008; Jeon et al., 2011).

1 MARCO TEÓRICO

A continuación se presenta una revisión general de las diferentes comunidades bacterianas asociadas a la biopelícula oral, infecciones orales más frecuentes y los distintos métodos que han sido utilizados para el control y equilibrio microbiano de la flora oral, además de nuevas alternativas en el uso de productos naturales con propiedades antimicrobianas importantes.

1.1 Comunidades bacterianas y biopelícula oral. La cavidad oral ofrece un entorno propicio para la colonización y crecimiento de un amplio número de microorganismos, de los cuales las bacterias son las más comunes. Su presencia es natural y esencial para el desarrollo normal de la fisiología de la misma (Marsh, 2010). La mucosa humana presenta diversas comunidades microbianas y ha sido estimado que más de 700 diferentes especies microbianas, son capaces de habitar en medio de interacciones sinérgicas, mutualistas y antagónicas entre los diferentes microorganismos, contribuyendo así al desarrollo y acumulación de comunidades polimicrobianas formando una biopelícula (Bamford et al., 2009; Marsh, 2010; Huang y Gregory, 2011; Rode Sde et al., 2012).

La biopelícula oral, está dividida en dos partes: la placa supragingival organizada por bacterias gram positivas incluyendo a las especies de *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. salivarius* y *Lactobacillus* spp (Kuramitsu et al., 2007; Linossier et al., 2011); y la placa subgingival, que está formada principalmente por bacterias anaerobias gram negativas, tales como

Actinobacillus spp, *Campylobacter* spp, *Porphyromonas gingivalis*, entre otras (Kuramitsu et al., 2007; Bamford et al., 2009; Nobbs et al., 2009; Rode Sde et al., 2012; Manna et al., 2013).

El equilibrio microbiano es afectado cuando suceden en la biopelícula alteraciones que conllevan a enfermedades, este desequilibrio, es producto de la respuesta a los cambios en las condiciones ambientales y alteran la competitividad de las bacterias (Marsh, 2010; Nyvad et al., 2013). En la etiología de la caries, el pH de la biopelícula juega un papel esencial, donde varios microorganismos producen ácidos orgánicos de los carbohidratos de la dieta fermentables (Schlafer et al., 2011; Gross et al., 2012). Esto disminuye el pH de la interfase biopelícula-diente por debajo de pH 5,5, favoreciendo así a las especies bacterianas acidogénicas y acidotolerantes, tales como las del grupo *Streptococcus*, específicamente *S. mutans* y *Lactobacillus* spp (Shrestha et al., 2011).

Además, otras enfermedades asociadas a la biopelícula oral están dadas dependiendo de la localización en el margen gingival en los cuales los microorganismos colonizan (Belibasakis et al., 2011). Esto puede ser subgingival cuando una respuesta inflamatoria limita a la superficie del tejido gingival y supragingival cuando la inflamación se expande sobre los tejidos profundos periodontales (Nobbs et al., 2009; Rode Sde et al., 2012).

De esta manera, cuando una respuesta inflamatoria induce daño a los tejidos en la superficie recibe el nombre de gingivitis (Belibasakis et al., 2011). Sin embargo, cuando la inflamación se extiende a los tejidos más profundos se convierte en una periodontitis, la cual se caracteriza por la destrucción de los dientes circundantes y la interconexión del ligamento periodontal que puede conducir a la pérdida de los dientes (Marsh, 2010; Belibasakis et al., 2011). Por lo tanto, La gingivitis y la periodontitis son consideradas enfermedades comunes relacionadas con la biopelícula oral, las cuales afectan a muchas personas en todo el mundo (Cortelli et al., 2010).

1.2 Caries dental. Es una enfermedad multifactorial infecciosa, causada por la microbiota cariogénica que constituye un problema de salud pública a nivel mundial (Huang et al., 2008; Jeon et al., 2011). Resulta de la disolución de minerales en el esmalte y la dentina de los dientes por los ácidos orgánicos que son los productos metabólicos finales secretados por ciertos microorganismos de la biopelícula dental (Giacaman et al., 2010; Cantekin et al., 2012). Los niños poseen el mayor riesgo de adquirirla, de igual manera los adolescentes, adolescentes adultos y los adultos mayores de 55 años (Taubman et al., 2005).

El principal agente etiológico en el desarrollo de la caries dental en humanos es *S. mutans* (Pidamale et al., 2012), frecuentemente aislado de la biopelícula oral (Ahn et al., 2008), cuya colonización en las superficies dentales ha sido considerado el primer proceso para la inducción de la caries dental, así como la presencia de

factores de virulencia incluidos en la patogénesis de esta enfermedad (Huang et al., 2008). Desde el punto de vista morfológico, *S. mutans* corresponde a un coco gram positivo. Capaz de producir una matriz extracelular rica en polisacáridos, que participa en el desarrollo de las biopelículas (Bowen and Koo., 2011). Sus necesidades bioquímicas las adquiere mediante la utilización de la sacarosa de la dieta.

Adicionalmente, este microorganismo posee factores de virulencia denominados factores cariogénicos, los cuales podrían enumerarse así: la adhesión o las bacterias adherirse firmemente a la superficie del diente en presencia de sacarosa, la cual es mediada principalmente por la acción enzimática de las enzimas glucosiltransferasas (Gtfs) (Napimoga et al., 2005). La acidogénicidad definida como la capacidad de producir ácido y la aciduricidad, la cual se entiende como la capacidad de tolerar el ácido (Matsui y Cvitkovitch, 2010).

Las Gtfs sintetizan glucanos de la fracción de glucosa de la sacarosa, las cuales son absorbidas en la superficie del esmalte de los dientes recubiertos de saliva (Jeon et al., 2011; Ogawa et al., 2011). Son fundamental para la virulencia de *S. mutans* en la patogénesis de la caries dental (Bowen y Koo., 2011). *S. mutans*, produce al menos tres (3) Gtfs separadas genéticamente: GtfB conocido como Gtfl el cual sintetiza principalmente glucano insoluble, la GtfC (GtfSI) produce una mezcla de glucanos solubles e insolubles y GtfD (gtfs) encargado de los glucanos solubles (Bowen y Koo, 2011).

La formación de la biopelícula está dada por la acumulación microbiana en la superficie del diente, proceso mediado por tres mecanismos sacarosa-dependientes. Los polisacáridos extracelulares están compuestos principalmente de glucanos, los cuales son sintetizados por Gtfs presentes en la saliva; estos proporcionan el sitio adecuado para la colonización de *S. mutans* y otros organismos acidogénicos y acidúricos (Jeon et al., 2011).

El otro factor de virulencia denominado acidogénicidad, depende de la cantidad de partículas de comida atrapadas en las superficies de los dientes y que pueden servir como fuentes de carbohidratos fermentables, promoviendo así la producción de ácido por la placa bacteriana (Wu, 2009). *S. mutans* posee la capacidad de fermentar una gran variedad de azúcares, siendo de especial interés metabolizar la sacarosa en ácido láctico con mayor rapidez que otras bacterias orales, esta propiedad está relacionada con las enzimas que expresa tanto para el transporte como para el metabolismo de la sacarosa (Kuramitsu, 1993).

Por último la aciduricidad, se constituye como la habilidad de tolerar ácido, este inicia la caries por la producción de ácido en el metabolismo de los carbohidratos de la dieta, la cual se da por el cambio del pH desde 7.0 una vez son estos ingeridos por el huésped hasta valores ácidos de pH 3.0 en menos de 20 minutos (Matsui y Cvitkovitch, 2010). *S. mutans* ha desarrollado varios mecanismos para sobrevivir a los cambios de pH encontrados en la placa, uno de ellos es el mecanismo ácido-inducido, denominado respuesta ácido tolerante (RAT) por

medio de la cual puede alterar su fisiología y sobrevivir en un ambiente ácido (Welin-Neilands y Svensäter, 2007; Matsui y Cvitkovitch, 2010).

1.3 Terapia antimicrobiana utilizada en la biopelícula. Los agentes antimicrobianos son utilizados para mantener la biopelícula en niveles compatibles con la salud oral, mediante la reducción de la biopelícula existente, evitando así la formación de biopelícula nueva, lo que inhibe de manera selectiva las bacterias, en particular aquellas asociadas con enfermedades, al igual que la expresión de determinantes de virulencia (Ellepola et al., 2011).

Una amplia gama de agentes han sido formulados en productos para el cuidado oral con el fin de mejorar el control de la biopelícula oral, reconociéndose entre ellos sales de metales (por ejemplo Zinc, Cobre, Estaño), fenoles (triclosán), bisbiguanidas (Clorhexidina), extractos de plantas y aceites esenciales (Yigit et al., 2008).

Otros productos tales como la Clorhexidina, con amplio espectro de actividad frente a las bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras, han sido útiles en la preparación de enjuagues bucales (Marsh, 2010). No obstante, la Clorhexidina ha sido asociado a efectos secundarios, tales como, la coloración marrón de los dientes, la lengua y la erosión de la mucosa oral (Harini y Anegundi, 2010).

1.4 Enjuagues bucales. Los enjuagues bucales son una herramienta cada vez más popular en el régimen de la higiene oral, de los cuales diferentes fabricantes comercializan estos productos en el área de los cosméticos y la medicina (Marcelis et al., 2010). Varios compuestos han sido evaluados para determinar su eficacia en la placa supragingival y la gingivitis, incluyendo bisbiguanidas (gluconato de clorhexidina), fenol, aceites esenciales, triclosán, compuestos de amonio cuaternario y extracto de hierbas (Botelho et al., 2007).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos productos podrían asociarse a enfermedades tales como cáncer oral y de faringe (Botelho et al., 2007; Marcelis et al., 2010). Debido a su uso, y a su contenido de alcohol. No obstante, esta apreciación todavía no ha sido demostrada, pero sería considerable eliminar el alcohol presente en los enjuagues bucales para uso diario y realizar la búsqueda de nuevas formulaciones (Marchetti et al., 2011).

Los aceites esenciales de las plantas son utilizados desde hace cientos de años en enjuagues bucales, y además han sido previamente probados tanto *in vivo* e *in vitro*, como agentes prometedores en el tratamiento de enfermedades orales y otras infecciones (Lobo et al., 2011; Marchetti et al., 2011).

1.5 Aceites esenciales y sus propiedades antimicrobianas. Recientemente, un gran número de los aceites esenciales y sus componentes han sido investigados por su actividad biológica, en particular las propiedades antibacterianas,

antifúngicas y antioxidantes, generando un creciente interés, debido a su gran aceptación tanto por los consumidores como múltiples usos (Zarai et al., 2011).

Los aceites esenciales poseen un amplio espectro de actividad, llegando a ser ambientalmente seguros y económicos (Lodhia et al., 2009). Las plantas producen una amplia gama de más de 100.000 metabolitos secundarios y estos pueden ser clasificados en tres grupos principales: los compuestos fenólicos, que se hacen a partir de azúcares simples, que contienen hidrógeno y anillos de benceno, oxígeno; y los terpenoides, que están formados por ácido mevalónico y compuestos casi en su totalidad por carbono e hidrógeno, y los alcaloides que son compuestos nitrogenados (Jeon et al., 2011).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales ha sido atribuida a los compuestos fenólicos, tales como el carvacrol, eugenol y timol, los cuales tienen características hidrofóbicas e interactúan con diferentes sitios de la célula microbiana, convirtiéndose en agentes potenciales contra bacterias gram positivas, negativas y levaduras (Teles and Teles, 2009; Qiu et al., 2010).

Actualmente, existe gran interés en los aceites esenciales debido a que son vistos como alternativas naturales preferenciales aún para los químicos y en algunos antibióticos (Jeon et al., 2011). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales ha sido demostrada frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, entre otras (Lodhia et al., 2009). Por lo tanto estas

sustancias son potentes contra un amplio espectro de bacterias orales y son utilizadas ampliamente en enjuagues bucales antisépticos (Wallace, 2004; Marchetti et al., 2011).

En las últimas décadas, ha habido un particular interés en la utilización de antimicrobianos de origen natural, debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, entre otros, convirtiéndose de esta manera en una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y en una alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Prabuseenivasan et al., 2006; Klančnik et al., 2010; Solórzano y Novales, 2012). Por lo tanto, han sido empleados métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de estos agentes naturales frente a microorganismos, uno de los más utilizados es la concentración mínima inhibitoria, la cual es definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento microbiano visible (Budzyńska et al., 2011).

Muchos aceites esenciales son conocidos por ejercer actividad antimicrobiana, sin embargo, su mecanismo de acción es poco entendido (Alviano y Alviano, 2009). Una de las características más importantes de estos productos naturales es su hidrofobicidad, el cual les permite crear particiones con los lípidos de la membrana celular bacteriana y las mitocondrias, alterando las estructuras de las células y así volviéndolas más permeables (Alviano y Alviano, 2009; Solórzano y Novales, 2012).

Los aceites esenciales son cada vez más de mayor interés, de los cuales un gran número de ellos han sido implementados además por sus propiedades insecticidas o repelentes contra diversas plagas de insectos (Olivero et al., 2009; Caballero et al., 2012). Dentro de estos productos naturales, los aceites esenciales más utilizados están *Cymbopogon* spp., *Ocimum* spp., y *Eucalyptus* spp., entre otras especies (Caballero et al., 2012).

Por otra parte, otros aceites esenciales de *limón*, *Citronella* y *geranio* han sido formulados en repelentes comerciales (Arthur et al., 2011), velas impregnadas y dispositivos de difusión (Revay et al., 2013).

Algunos reportes han provisto información de la actividad repelente de algunos aceites esenciales tales como *Cymbopogon martinii* "palmarosa", *Cymbopogon flexuosus* "limón", *Lippia origanoides* "orégano silvestre" y *Citrus sinensis* "naranja"; demostrando la actividad repelente sobre el escarabajo rojo, *Tribolium castaneum*, una plaga que vive en los granos almacenados y afecta la producción de alimentos mediante la reducción de la calidad y cantidad de la cosecha producida (Olivero et al., 2009; Caballero et al., 2012). En la Tabla 1 están resumidos algunos aceites esenciales extraídos de plantas colombianas que han sido investigados por su actividad repelente (Jaramillo et al., 2012). Este reporte fue proporcionado por el Centro de Investigación de Excelencia de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia (CENIVAM).

Tabla 1. Listado de algunos aceites esenciales extraídos de plantas Colombianas.

Tomado de Jaramillo et al., 2012.

Especies	Familia	Localización
<i>Achyrocline olata</i>	Asteraceae	Potosí/Nariño
<i>Condylidium cuatrecosasii</i>	Asteraceae	Piedecuesta/Santander
<i>Hyptis mutabilis</i>	Lamiaceae	Villavicencio/Meta
<i>Lepechinia betonicifolia</i>	Lamiaceae	Bogotá/Cundinamarca
<i>Lepechinia schiedeana</i>	Lamiaceae	Bucaramanga/Santander
<i>Ocinum campechianum</i>	Lamiaceae	Tolú Viejo/Sucre
<i>Lippia alba</i>	Verbenaceae	Colorado/Bolívar
<i>Lippia alba</i>	Verbenaceae	Bucaramanga/Santander
<i>Lippia organoides</i>	Verbenaceae	Soatá/Boyacá
<i>Lippia organoides</i>	Verbenaceae	Pedregal/Nariño
<i>Lippia organoides</i>	Verbenaceae	Bucaramanga/Santander
<i>Lippia organoides</i>	Verbenaceae	Bucaramanga/Santander
<i>Montanoa ovalifolia</i>	Rivularaceae	Tibasosa/Boyacá

Por otra parte, de acuerdo a la actividad antimicrobiana que presentan algunos aceites esenciales, el *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae) comercialmente conocido es la principal fuente de aceite de eucalipto en el mercado mundial con el nombre de “aceite de eucalipto” y ha sido utilizado como antiséptico, ayuda a aliviar los síntomas de la tos, el resfriado, el dolor de garganta y otras infecciones (Mulyaningsih et al., 2011). Además, ingredientes activos de algunos enjuagues bucales comerciales incluyen el mentol, el eucalipto y el timol para controlar los niveles de bacterias cariogénicas y la formación de biopelícula oral (Bagan et al., 2012).

Para el caso de la *Mentha piperita*, el cual es uno de los ingredientes más populares del té de hierbas, reconocido por su sabor y su aroma refrescante, con propiedades antimicrobianas reportadas para la *Clamydia pneumoniae*, *S. mutans*, entre otros (Rasooli et al., 2008; Kapp et al., 2013).

Por su relevante actividad, estos productos naturales han recibido gran atención y hoy en día se les consideran beneficiosos (De Rapper et al., 2013). Por lo tanto, son utilizados en los campos de la dermatología, la gastritis, problemas respiratorios, infecciones orales, cicatrización de heridas, e infecciones genitales (De Rapper et al., 2013). Es así como los aceites de *Cinnamomum verum*, *Cymbopogon citratus*, *Origanum compactum*, *Thymus vulgaris* y *Satureja montana*, han sido evaluados frente a *Streptococcus pyogenes*, considerándose los más activos contra este patógeno, principal causante de la amigdalitis (Sfeir et al., 2013). Así mismo, ha sido utilizado frente a *Rosmarinus spp*, *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* y *S. sobrinus*, así como lo son frente a *Enterococcus faecalis*, microorganismos potencialmente responsables de la formación de la caries dental (Bernardes et al., 2010).

Los aceites esenciales son usados también en la aromaterapia, una forma de medicina complementaria y alternativa para una variedad de aplicaciones, incluyendo la mejora del humor, el alivio del dolor, la ansiedad, la depresión, el estrés y la mejora de la función cognitiva, entre otros (Setzer, 2009; Zhang et al., 2013). Comercialmente “el aceite de lavanda” fabricado a partir de *Lavandula*

angustifolia es muy popular (de Rapper et al., 2013; Zhang et al., 2013). De igual manera, “La hierba de limón” *Cymbopogon citratus* ha sido utilizada en la aplicación de la terapia naturista por sus propiedades anti-amebianos, antibacterianos, antidiarreicos, antifiláricos, antifúngica y anti-inflamatoria (Shah et al., 2011).

Otros aceites ansiolíticos son muy populares, tales como la “lavanda” (*Lavandula angustifolia*), “rosa” (*Rosa damascena*), “naranja” (*Citrus sinensis*), “bergamota” (*Citrus aurantium*), “limón” (*Citrus limon*), “sándalo” (*Santalum álbum*), “salvia” (*Salvia sclarea*) y “manzanilla romana” (*Anthemis nobilis*), entre otros (Setzer, 2009; Zhang et al., 2013).

Lippia origanoides (Familia: Verbenaceae) es un arbusto aromático o un árbol pequeño (hasta 3 m de altura) nativa de América Central y el norte de América del Sur (Figura 1). Ampliamente usado como condimento en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias (Oliveira et al., 2007).

En Colombia, *L. origanoides* es comúnmente conocida como "Orégano de monte" con propiedades antimicrobianas, antiparasitarias e insecticidas, destacándose por sus principales compuestos, carvacrol y timol (Vicuña et al., 2010).

El aceite esencial *Mentha piperita* perteneciente a la Familia Labiatae y al género *Mentha*. Es una planta herbácea de pequeño tamaño. A nivel mundial las hojas son utilizadas en diversas formas de preparación (Taher, 2012). Considerada una de las diez plantas tradicionales de Brasil (Figura 1). Cuya utilidad está dada comúnmente en el resfriado común, la bronquitis, la fiebre, las náuseas, los vómitos, cólicos, antimicrobianos y antioxidantes, entre otros (Barbalho et al., 2011; Kapp et al., 2013). *M. piperita* cuyo componente principal es el mentol, posee una demostrada actividad antimicrobiana, formación antibiopelícula, analgésica, antioxidante, entre otras características (Saharkhiz et al., 2012; Taher, 2012).



Figura 1. Plantas de *Lippia origanoides* "Orégano de monte" y *Mentha piperita* "menta".

Tomado de CENIVAM.

1.5.1 Efectos biológicos de los aceites esenciales. Estas sustancias naturales son reconocidas por sus propiedades antisépticas, tales como bactericida, virucida y fungicida, además poseen una amplia gama de usos en la medicina, la

protección de cultivos, saborizantes, fragancias y en industrias de alimentos entre otras aplicaciones (Ipek et al., 2005; Bakkali et al., 2008; Hyldgaard et al., 2012).

Por otra parte, recientemente ha sido demostrado que los aceites esenciales actúan como prooxidantes, afectando las membranas celulares internas y organelas, tales como mitocondrias. Dependiendo del tipo y la concentración, pueden exhibir efectos citotóxicos en células vivas, y a su vez ser genotóxicos (Bakkali et al., 2008). Los efectos citotóxicos de los mismos han sido evaluados *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer humano, específicamente en HepG2, MIA PaCa-2, HeLa, entre otras (Yan et al., 2009; Mulyaningsih et al., 2010).

En algunos casos, los aceites esenciales pueden estar asociados por esa capacidad de ejercer efectos antígenotóxicos, los cuales podrían estar relacionados con la presencia de algunos componentes principales de estas sustancias naturales (Ipek et al., 2005).

1.5.2 Métodos para determinar genotoxicidad, toxicidad de las plantas y sus productos naturales.

Las plantas y sus productos naturales han recopilado información acerca de su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades comunes, convirtiéndose en alternativas mundiales (Alviano y Alviano, 2009). Por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, pocos estudios de toxicidad han sido evaluados.

Sin embargo, los más utilizados son el ensayo Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) y actualmente el ensayo cometa (Bakkali et al., 2008; Ouedraogo et al., 2012).

El Ensayo MTT Figura 2, es considerado un método colorimétrico ampliamente utilizado para estudiar la citotoxicidad y la viabilidad celular (Ulukaya et al., 2008). Su fundamento consiste en la formación de una solución acuosa amarilla que es reducida por las deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células metabólicamente activas a un producto denominado Formazan, de color azul-violeta (Stockert et al., 2012).

De esta manera, la capacidad de las células para la reducción del MTT a Formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto evaluado (Ulukaya et al., 2008).

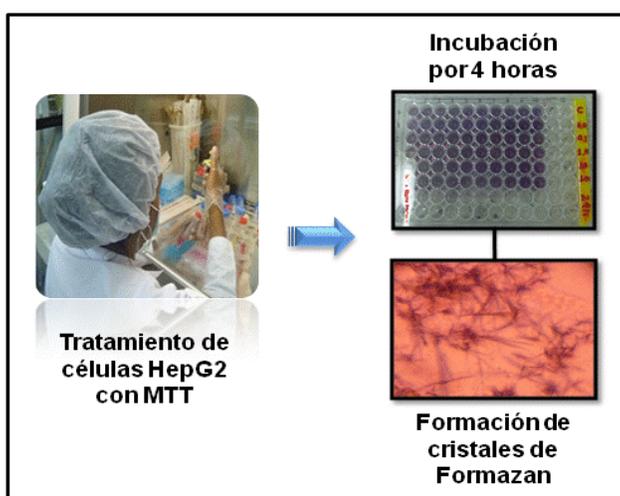


Figura 2. Ensayo MTT.

El método de ensayo cometa Figura 3, es un ensayo de genotoxicidad simple, rápido y económico, ampliamente utilizado para la evaluación de daño en las cadenas del ADN. Por su alta sensibilidad, posee ventajas sobre el ensayo de micronúcleos debido a su capacidad de detectar rupturas de hebras de ADN en células individuales, por esta razón es denominado electroforesis en gel de una única célula (Lee y Steinert, 2003). Este ensayo es utilizado para visualizar los fragmentos de ADN desnaturalizados, los cuales migran fuera del núcleo durante la electroforesis. La imagen obtenida es un “cometa” con una cabeza distinta que consiste en ADN intacto y una cola que contiene las rupturas de las hebras de ADN (Berthelot et al., 2011).

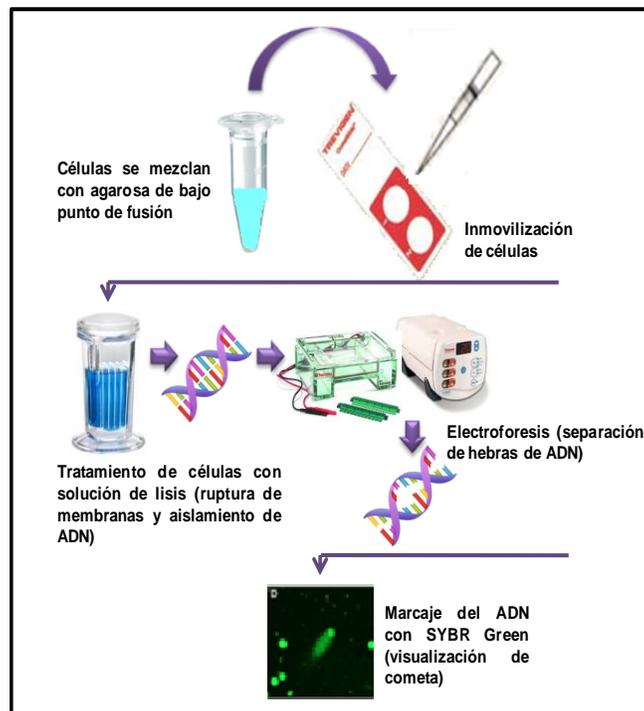


Figura 3. Procedimiento realizado para la evaluación del ensayo cometa. Fuente:

Modificado de <http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx>.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana del enjuague bucal a base de *Lippia origanoides* y *Mentha piperita* frente a la flora oral de estudiantes de la Universidad de Cartagena.

2.2 Objetivos específicos

- Valorar la toxicidad y genotoxicidad del aceite esencial *Lippia origanoides* con ensayos *in vitro* en células HepG2.
- Comparar la actividad microbiológica del enjuague bucal natural preparado a partir de los aceites esenciales *Lippia origanoides* y *Mentha piperita* frente a un enjuague bucal comercial.
- Valorar la actividad microbiológica del enjuague bucal natural frente a cepas ATCC de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* por el método de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3 METODOLOGÍA

La metodología de este trabajo de investigación estuvo enmarcada en cinco etapas descritas a continuación. Así mismo, los métodos se resumen en las Figuras 4 y 5.

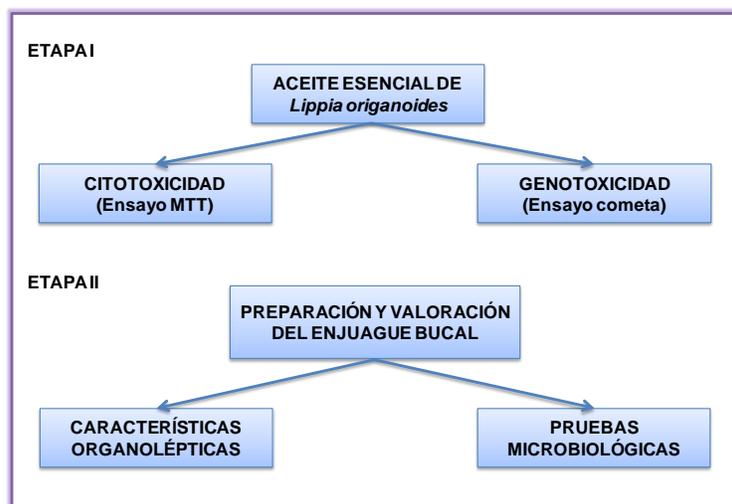


Figura 4. Procedimiento general para la valoración del enjuague bucal natural (CENIVAM, 2012).

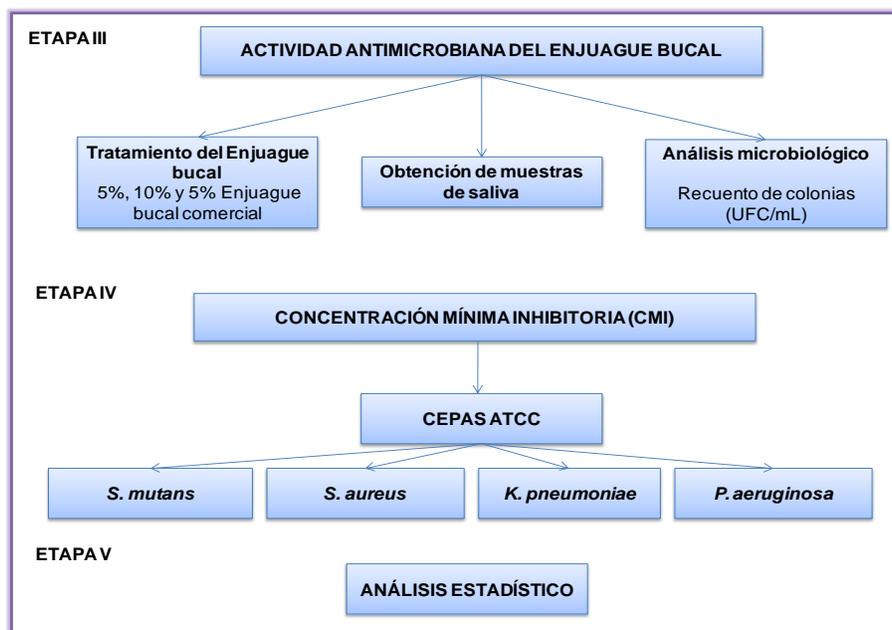


Figura 5. Procedimiento general de los análisis microbiológicos del enjuague bucal natural.

3.1 Etapa I. Evaluación *in vitro* de la toxicidad del aceite esencial de *Lippia origanoides* en células HepG2.

El test *in vitro* para la evaluación del aceite esencial de *Lippia origanoides* en células HepG2 fue realizado utilizando los métodos de ensayo MTT y ensayo cometa evaluando la toxicidad y genotoxicidad de este producto natural, el cual es uno de los ingredientes activos del enjuague bucal natural “Limpieza refrescante” (Oliveira et al., 2007; Vicuña et al., 2010).

Para su realización fue utilizada una línea celular HepG2 (American Type Culture Collection (ATCC). Reference HB-8065. LOT: 58987012, la cual estuvo mantenida en condiciones de laboratorio utilizando el medio de cultivo DMEM (Código 10567; Invitrogen, NY, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, USA) y penicilina-eritromicina (Sigma, USA) de acuerdo con el protocolo descrito por Donato (2008). Luego para las pruebas de citotoxicidad, el método utilizado fue el ensayo Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT, M5655 Sigma), el cual fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Zarai (2011).

Las células HepG2 (células de hepatocarcinoma) fueron depositadas en platos de cultivo para ser expuestas a diluciones del aceite esencial *L. origanoides* a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1.0, 10 y 100 µg/mL) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO: C₂H₆OS, Merck) por un período de 24 horas. Las células

fueron posteriormente lavadas con buffer fosfato salino (PBS), tratadas con MTT por 4 horas a 37°C para promover la formación de los cristales de Formazan, los cuales luego fueron sucesivamente disueltos con dimetilsulfóxido (DMSO: C₂H₆OS, Merck). La viabilidad de las células fue determinada al comparar las lecturas espectrofotométricas de los grupos tratados con respecto al control utilizando el equipo Multiskans ascent (Thermo scientific, Germany) a una longitud de onda de 540 nanómetros (nm) (Wagner-Döbler et al., 2005). El fundamento de este ensayo es presentado de manera esquemática en la Figura 6.

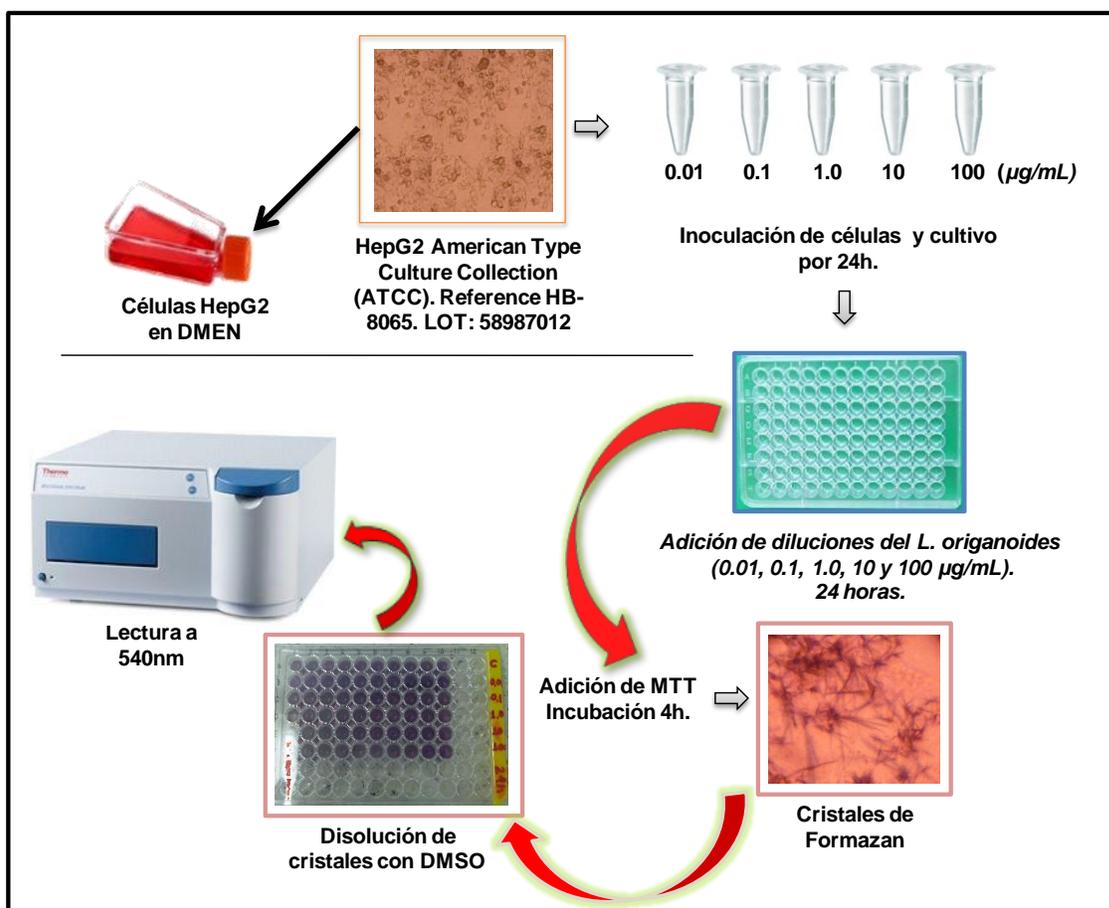


Figura 6. Procedimiento realizado para la evaluación del ensayo MTT.

Además, fue utilizada la prueba de genotoxicidad mediante el ensayo cometa neutro propuesto por Trevigen (Trevigen; Gaithersburg, MD) con algunas modificaciones (Cabarcas et al., 2012). Para la evaluación del daño al ADN, las células HepG₂ tratadas y los controles fueron suspendidos en gel de agarosa sobre un portaobjetos CometSlide™ (trevigen, CAT 425005003) y sumergidas posteriormente en una solución de lisis preenfriada por 1 hora (Cabarcas et al., 2012). Una vez lavados, los portaobjetos fueron llevados a la cámara de electroforesis aplicando un voltaje de 1 V/cm por 1 hora. Finalmente, SYBR® Green (Fermentas, USA) fue utilizado para el marcaje de ADN y su visualización fue hecho utilizando el microscopio de epifluorescencia (NIKON, USA). Las imágenes de las células seleccionadas fueron analizadas al azar en cada uno de los pozos del portaobjetos para su clasificación de acuerdo con el daño al ADN (Burlinson, 2012; Hartley et al. 2011).

Tabla 2. Clasificación de los diferentes niveles de daño al ADN.

Clasificación de daño al ADN	
Etapa 0	Células sin daño.
Etapa 1	Células con menor daño.
Etapa 2	Células con la cola igual o menor del tamaño de la cabeza.
Etapa 3	La cola es mayor que el tamaño de la cabeza.
Etapa 4	Daño mayor, no se le observa la cabeza.

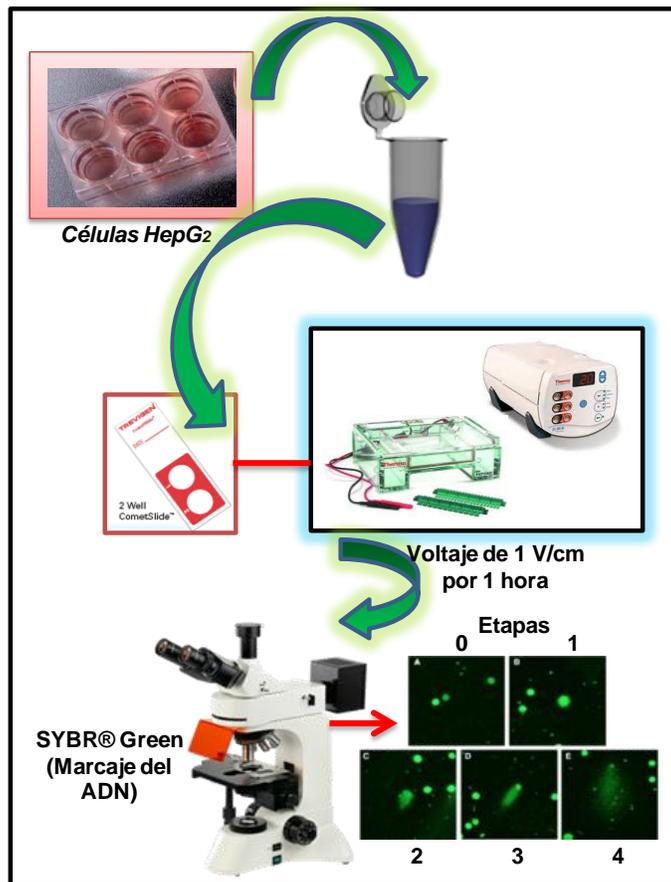


Figura 7. Metodología y fundamento del ensayo cometa (Burlinson, 2012) para evaluar la genotoxicidad del aceite esencial *L. origanoides*, un componente del enjuague bucal 100% natural.

3.2 Etapa II. Preparación y valoración del enjuague bucal. El enjuague bucal utilizado en esta investigación es 100% natural. Fue patrocinado por el centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales – CENIVAM, y fabricado en las instalaciones del Grupo de Química Ambiental y Computacional. Actualmente, el trámite de su registro para el INVIMA está en proceso.

Antes de iniciar los análisis correspondientes a determinación de la calidad de este producto, fue necesario tener en cuenta las normas de calidad de uso de enjuagues bucales para el cuidado oral establecido en la Norma Técnica Colombiana número o identificada (NTC 5257), la cual establece que para garantizar su control y calidad en este tipo de producto será sometido a los siguientes ensayos: características organolépticas y pruebas microbiológicas.

3.2 a. Preparación del enjuague bucal: Para 100 mL del enjuague bucal fue utilizado propilenglicol, los aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Mentha piperita* designados, en cantidades de 20 μ L y 2000 μ L respectivamente. Luego, en agua desionizada caliente fueron agregados sorbitol (6.3 g) y glicerina (0.6 g), estos fueron mezclados bien por 3 minutos y finalmente fue agregado citrato de sodio, ácido cítrico y un colorante verde menta. Todo el proceso de preparación fue realizado con agitación continua.

Características organolépticas: De acuerdo a lo anterior, primero fueron realizadas las pruebas organolépticas, para tal fin fueron seleccionados un grupo de 15 personas voluntarias de la Universidad de Cartagena, de ambos sexos. Inicialmente fue realizada la valoración organoléptica del enjuague bucal 100% natural. Seguido de la prueba de aceptabilidad del mismo, la cual fue evaluada teniendo en cuenta el color, sabor, olor y sensación de aliento refrescante, estableciendo una calificación en escala de 1 a 10 para cada uno de los atributos siguiendo el protocolo descrito por Shinada (2010).

Cada uno de los participantes voluntarios fue orientado acerca del objetivo del trabajo con la aplicación de una encuesta y el previo consentimiento informado (Anexo 1) y siguiendo los lineamientos del Artículo 11 Resolución 008430, 1993 del Ministerio de Protección Social, Protocolo de Helsinki. Estos individuos, una vez aceptaron, fueron instruidos para realizar el enjuague de la boca con 5 (cinco) 5 mL del enjuague bucal durante aproximadamente 1 minuto de acuerdo al procedimiento descrito por Shinada (2010).

Pruebas microbiológicas: Fueron realizados de acuerdo con los protocolos descritos por Veléz y Cuadrado (2005) mediante la valoración de la ausencia/presencia de microorganismos aerobios y/o anaerobios facultativos viables tales como bacterias, hongos y levaduras. Para la búsqueda de microorganismos fue utilizado el método de recuento de aerobios mesófilos con el medio de cultivo *Agar Plate Count* (Merck, Germany), coliformes totales, fecales y

para la determinación de *E. coli* fue utilizado el medio de cultivo *Agar Chromocult* (Merck, Germany). Además, para los recuentos de mohos y levaduras fue utilizado el medio *Agar Sabouraud* 4% de glucosa (Merck, Germany). El enjuague bucal fue sometido a diluciones seriadas, las cuales fueron preparadas de la siguiente manera: del producto final utilizando agua peptonada pH 7.0 (Merck, Germany), fueron preparadas diluciones en 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} agitando varias veces. De cada dilución 1mL fue sembrado por extensión con incubación a 37°C por 48h. El recuento de mohos y levaduras fue sometido a incubación a 25°C - 30°C durante 5 días en incubadora (Inducell, USA). Todos los procedimientos de esta etapa fueron realizados por triplicado.

3.3 Etapa III. Actividad antimicrobiana del enjuague bucal natural. El desarrollo de esta etapa fue dividida de la siguiente manera:

Tratamiento del enjuague bucal. Durante el desarrollo de esta etapa, previamente a partir de alícuotas del medio de cultivo Luria Bertani (LB, Merck, Germany) con un volumen final de 100 mL, fueron preparadas cuatro (4) concentraciones que consistieron en: 5 % y 10 % del enjuague bucal natural y 5 % del enjuague bucal comercial siguiendo el protocolo descrito por Lobo (2011). Los medios preparados fueron distribuidos en cajas de petri, adicionando un volumen de 25 mL en cada caja, respectivamente. En este ensayo la concentración denominada como cero (0 %) fue utilizada como control, el cual fue considerado para fines comparativos durante el análisis de los datos. Todos los tratamientos

fueron realizados por triplicado y en cámaras de anaerobiosis (Oxoid, Germany) para el control de la esterilidad.

Obtención de muestras. Para la toma de las muestras fueron convocados 70 estudiantes de la Universidad de Cartagena de diferentes Facultades.

Dado que el estudio es de variable cualitativa, y la población es conocida, el tamaño de la muestra fue calculado utilizando la fórmula: (Daniel Wyne, 2000).

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1) + Z^2pq}$$

Donde

N: Tamaño de la población o universo

n: Tamaño de la muestra obtener (número de encuestas a realizar)

Z: Nivel de confianza (según la distribución normal estándar, para esta investigación $Z=1.96$)

d: Error muestral deseable (en este trabajo $d=0.1$)

p: Proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio

q: Proporción de individuos que no poseen esa característica, es decir, es $1-p$.

Como *p* es generalmente desconocido, se suele suponer que $p=q=0.5$ que es la opción más segura, porque está dando la misma probabilidad a los grupos.

La toma de las muestras de saliva fue realizada siguiendo los protocolos descritos por Tabchoury (2008) y Lobo (2011). Los estudiantes fueron informados y de manera voluntaria en el horario de la mañana les fueron practicados los análisis correspondientes. La recolección de 1ml de saliva previo a la masticación de un pedazo de Parafilm de 3x3 cm durante 60 segundos, esto con el fin de estimular la secreción y liberación de la placa en el fluido salival. Después fueron almacenadas en tubos eppendorf estériles y finalmente diluciones de 1:100, 1:1000 y 1:10000 fueron realizadas con cloruro de sodio 0.9% (NaCl) estéril.

Análisis microbiológico de la saliva. Una vez fueron preparados los diferentes medios de cultivos necesarios con las diferentes concentraciones detalladas en las etapas anteriores, la dilución correspondiente a 1:10000 fue escogida. Una siembra masiva en caja de petri, con una cantidad de 100 µL en cada caja con las respectivas concentraciones del enjuague bucal. Los cultivos fueron sometidos a condiciones de anaerobiosis (incubación a 37°C por 24h) en jarras de anaerobiosis (Oxoid, Germany) con condiciones microaerofílicas, de acuerdo con Bothelho (2009). Con base, en la literatura, finalmente, fueron realizados los recuentos y estos resultados fueron expresados en unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/mL).

3.4 Etapa V. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para la realización de la concentración mínima inhibitoria (CMI) cepas de microorganismos: tales como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella*

pneumoniae (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fueron usadas, cultivadas y estandarizadas. Inicialmente, cada una de las cepas fueron adaptadas a medios de cultivo caldo Mueller Hinton (BD, BBL, USA) a 35°C y 37°C, y después inoculados sobre agar Mueller Hinton (Oxoid, England). Todos los microorganismos fueron recuperados finalmente en caldo Mueller Hinton (BD, BBL, USA) para ser usados de manera inmediata, otra parte fue almacenada en medios de cultivo de mantenimiento para las replicas posteriores.

Para la realización de MIC fue utilizado el método microdilución en caldo con placas de 96 pozos. Utilizando la escala de McFarland 0,5 (1.0×10^8 UFC/mL) (Alviano y Alviano, 2009). En este procedimiento cuatro (4) concentraciones fueron utilizadas en 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL y 200 mg/mL del enjuague bucal natural. Del mismo modo dos controles fueron incluidos: uno positivo y otro negativo utilizando Kanamicina (30 mg/mL) (Sigma, USA) y caldo con agua, las placas fueron incubadas a 37°C por 24h.

Para la determinación del número de células, las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro Multiskans ascent (Thermo Scientific, Germany) a una longitud de onda de 620 nm (Wagner- Döbler et al., 2005). Todas las pruebas fueron desarrolladas por triplicado (Işcan et al., 2002; Rasooli et al., 2008; Lobo et al., 2011).

3.5 Etapa V. Análisis estadístico. Todos los datos obtenidos durante cada una de las etapas de esta investigación son presentados como la media geométrica de los recuentos en UFC/mL \pm Error estándar para cada una de las concentraciones evaluadas. Para establecer la normalidad de los datos, pruebas de distribución normal, tales como: Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de varianzas fueron utilizadas respectivamente. La T de student fue utilizada para la comparación de las medias de las diferentes variables evaluadas. En todos los casos el nivel de significancia fue establecido a un valor de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Etapa I. Evaluación *in vitro* de la toxicidad del aceite esencial *Lippia origanoides* en células HepG2.

Los efectos de las diferentes concentraciones (0,01-100 µg/mL) del aceite esencial *L. origanoides* sobre células HepG2 fue estudiado. El porcentaje de viabilidad de células HepG₂ fue 115.9 %, 102.4 %, 105.2 % 114.9 % y 97.5 %, respectivamente. Esto demuestra que a bajas y altas concentraciones las células pueden tolerar el aceite (Zarai et al., 2011).

Con los resultados del ensayo MTT en este estudio, luego de la exposición de las células HepG2 a las diferentes concentraciones del aceite de *L. origanoides*, son presentados a continuación en la Figura 8. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de viabilidad para las diferentes concentraciones de aceite esencial de *L. origanoides* evaluadas en el ensayo, al ser comparadas con el control negativo, convirtiéndolo claramente en un componente terapéutico de amplio alcance (Vicuña et al., 2010). Al igual que al evaluar los controles, el control positivo presentó una disminución significativa de la viabilidad celular. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura (Zarai et al., 2011).

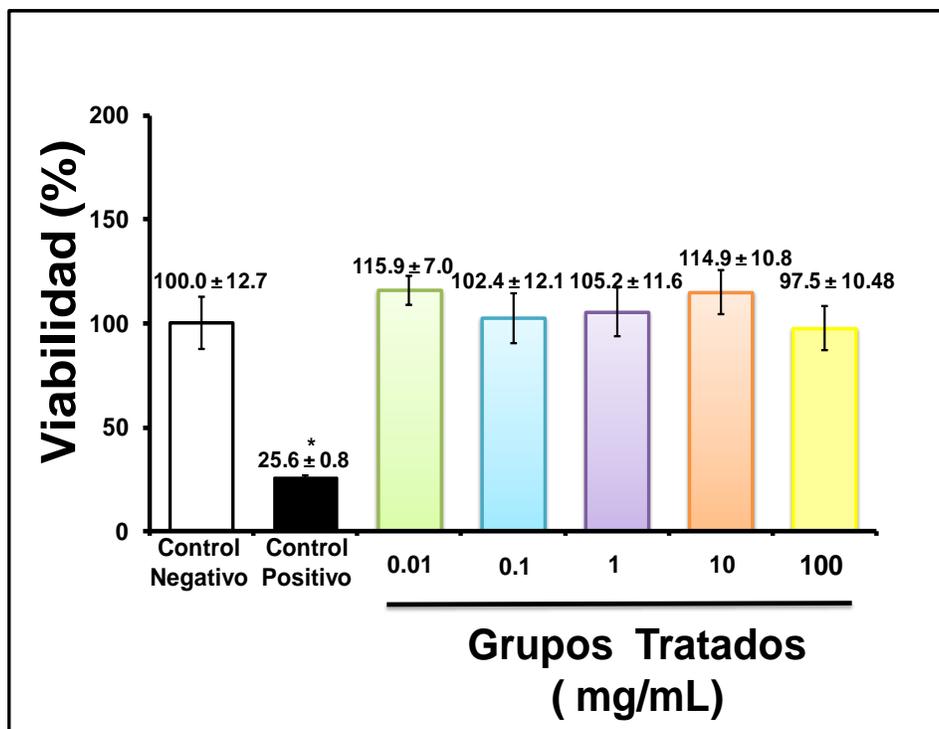


Figura 8. Resultados del ensayo de MTT para células HepG2 expuestas al aceite esencial de *L. origanoides*. Los valores son expresados como la media de al menos 3 experimentos independientes. *. Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada con el control negativo.

A través de los años, un número de técnicas han sido reportadas para la determinación de la citotoxicidad *in vitro* y la viabilidad celular, siendo técnicas sensibles y fiables de bajo costo (Bean et al., 1995; Nath et al., 2005; Stockert et al., 2012). Así mismo, éstas han sido aplicadas para investigar perfiles de citotoxicidad de plantas y agentes quimioterapéuticos (Ulukaya et al., 2008; Naidoo et al., 2013).

Los ensayos de citotoxicidad celular son ampliamente utilizados en estudios de toxicología *in vitro* (Liu y Zeng, 2009). El ensayo MTT es uno de los métodos más empleados para el estudio de citotoxicidad o viabilidad celular seguido de la exposición a sustancias tóxicas (Ulukaya et al., 2008; Liu y Zeng, 2009).

4.1.1. Pruebas de Genotoxicidad: Teniendo en cuenta las concentraciones probadas (0,01-100 µg/mL) del aceite esencial sobre las células HepG2 el porcentaje de daño del ADN fue de 93.89 %, 68.72 %, 41,62 %, 69.13 % y 61.89 % respectivamente para las células de las etapas 0 y 1. Por otro lado, el porcentaje de daño de ADN en las concentraciones de (0,01-100 µg/mL) para la etapa 2 fue de 3.19 %, 11,20 %, 12,66 %, 4,29 %, 10,07 % respectivamente y el porcentaje de daño para las etapas 3 y 4 fueron de 2,92 %, 20,08 %, 45,73 %, 26.40 %, 26,69 %, 0,10 % y 1,35 %.

De esta manera, al exponer durante un tiempo de 24 horas, las células HepG2 a las diferentes concentraciones de *L. origanoides*, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) comparadas con el control negativo. Por lo anterior, las concentraciones más bajas sugieren una baja sensibilidad de las células HepG2 a *L. origanoides* (Ouedraogo et al., 2012). Los resultados de este estudio son presentados en la Figura 9 como el porcentaje de daño en el ADN de las células clasificado en las etapas 0 y 1, 2, 3, 4.

De acuerdo a lo anterior, una de las herramientas destinadas a evaluar efectos genotóxicos en la biota es el ensayo cometa neutro, un método basado en electroforesis que es capaz de detectar rupturas de cadenas sencillas y de doble cadena en células individuales (Collins et al., 2008; Tice et al., 2000).

Varios estudios de genotoxicidad son llevados a cabo *in vitro* utilizando células de mamíferos (células HepG2), bacterias entre otros (Valentin et al., 2003). Además, este método ha sido probado para productos químicos individuales y para el estudio de los productos naturales se ha convertido en un nuevo reto (Ouedraogo et al., 2012). Por lo tanto, a través del ensayo cometa es evaluado el daño en el ADN a partir de la migración de este en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico (Horváthová et al., 2006).

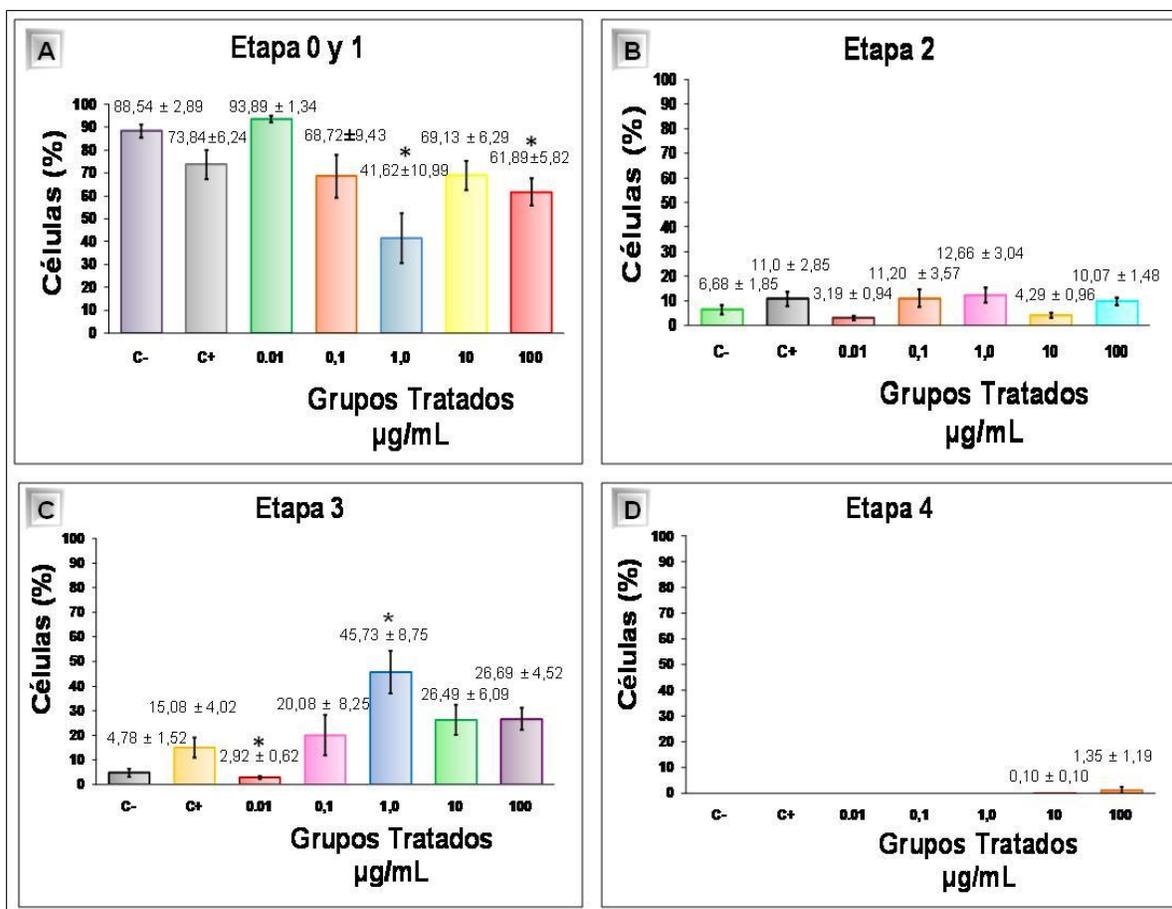


Figura 9. Resultados del ensayo cometa en las células HepG2 tratadas y controles. A) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 0 y 1; B) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 2; C) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 3; D) Porcentaje de daño al ADN en las células en etapa 4. *.Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) comparadas con el control negativo.

4.2. Etapa II. Preparación y valoración del enjuague bucal.

Características organolépticas: Durante la realización de los ensayos, primero fueron realizadas las pruebas organolépticas. Se inició tomando como referencia que los voluntarios de este análisis completaran de manera satisfactoria la

valoración organoléptica de acuerdo con lo expuesto en la Figura 10. La aceptabilidad del enjuague bucal fue valorada estableciendo una calificación en escala de 1 a 10 para los atributos: color, sabor, olor y sensación de aliento refrescante.

Luego de evaluadas las características organolépticas, la puntuación fue representada en la Figura 6 de acuerdo con lo siguiente:

10	9	8	7	6
Excelente color, olor, sabor y aliento refrescante	Buen color, olor, sabor y aliento refrescante	Moderado color, olor, sabor y aliento refrescante	Leve color, olor, sabor y aliento refrescante	Apenas perceptible el color, olor, sabor y aliento refrescante

Por lo anterior, los resultados de este estudio demostraron que el enjuague bucal tuvo una efectiva aceptación, del cual siete (7 %) voluntarios reportaron un excelente color, cuatro (4 %) informaron un excelente olor, por otro lado, cuatro (4 %) percibieron un excelente sabor y dos (2 %), una excelente sensación de aliento refrescante (Shinada et al., 2010).

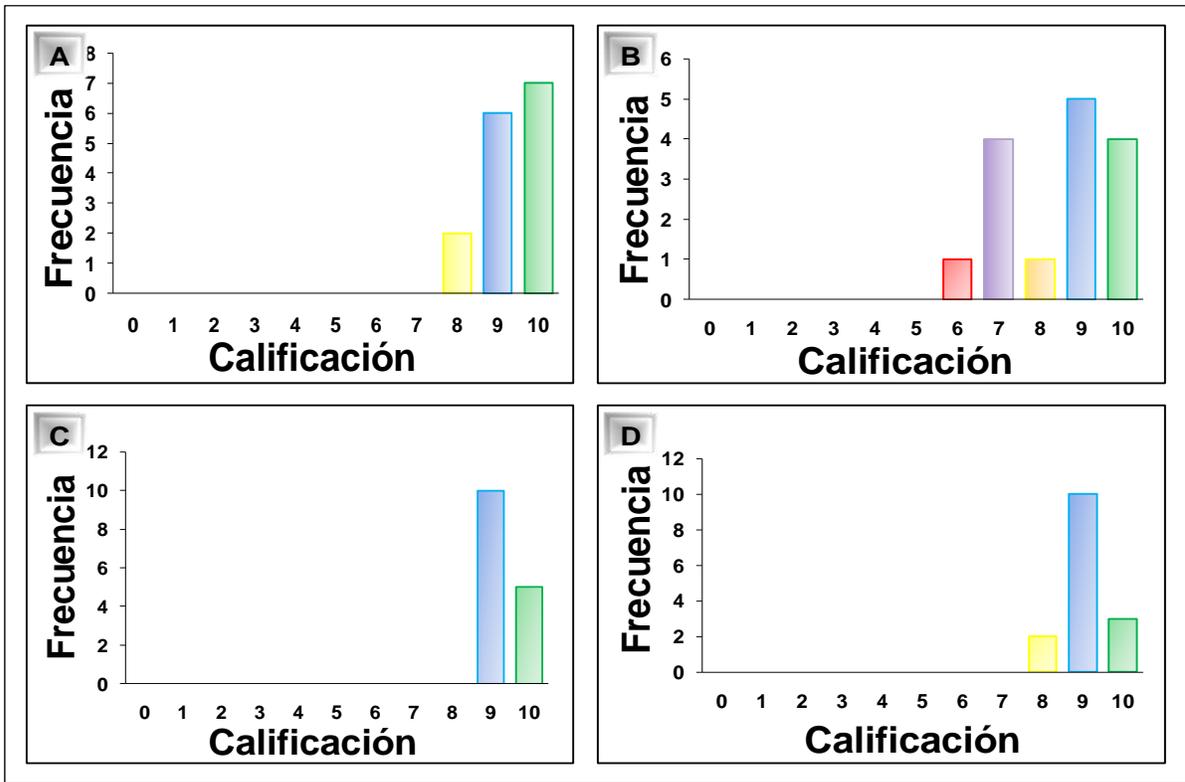


Figura 10. Descripción de la evaluación organoléptica en puntajes para cada uno de los atributos evaluados para el enjuague bucal natural. A. Color, B. Olor, C. Sabor, D. Sensación de aliento refrescante.

Pruebas microbiológicas: Con el fin de garantizar la calidad y esterilidad del enjuague bucal 100% natural, fueron realizadas las siguientes pruebas microbiológicas: recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, determinación de la presencia de *E. coli*, mohos y levaduras. Los resultados son descritos a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Pruebas microbiológicas del enjuague bucal natural.

Análisis	Temperatura, Tiempo de incubación	Resultados
Recuento de aerobios mesófilos	37°C/48h	Ausencia
Coliformes totales y fecales	37°C/48h	Ausencia
<i>E. coli</i>	37°C/48h	Ausencia
Mohos y levaduras	30°C/5 días	Ausencia

De acuerdo con la literatura, es necesario analizar formulaciones de productos para el uso y consumo humano con las pruebas microbiológicas como control, lo cual sugiere el uso de medios de cultivos especiales para el análisis microbiano a fin de evitar la contaminación con microorganismos y de esta manera, garantizar que su uso sea seguro (Velez y Cuadrado, 2005; Riley y Li, 2011). Los análisis microbiológicos, llevados a cabo en todos los cultivos microbiológicos fueron satisfactorios, de acuerdo con las normas utilizadas y validadas por la FDA (Food and Drug Administration, 2012).

La Administración de Drogas y Alimentos exigen que los productos farmacéuticos estén libres de microorganismos viables (Workman y Clayton, 1996; Riley y Li, 2011). Para lograr que un producto sea de consumo para los seres vivos, una de las pruebas de importancia en el control de medicamentos, productos farmacéuticos, productos de fabricación, entre otros, es el fundamento de la prueba de esterilidad, la cual consiste en realizar procedimientos asépticamente.

Teniendo en cuenta cada uno de los factores involucrados en la prueba, tales como: la esterilidad del medio de cultivo, presencia de bacterias, hongos o levaduras viables (Workman y Clayton, 1996). Además de otros métodos de análisis que incluyen los ensayos físicos y químicos que aseguren evitar consecuencias por su uso (Velez y Cuadrado, 2005).

4.3 Etapa III. Actividad antimicrobiana del enjuague bucal natural.

Tratamiento del enjuague bucal. Por lo general, el uso de agentes químicos para controlar una buena higiene oral y principalmente la formación de biopelícula oral ha sido estudiado para muchos propósitos clínicos, incluyendo por ejemplo, el desarrollo de enfermedades orales más frecuentes, tales como la caries, la enfermedad periodontal y la halitosis (Oyanagi et al., 2012; Rode Sde et al., 2012).

Así mismo, la industria farmacéutica ha buscado formas químicas para prevenir la formación de la biopelícula oral, como consecuencia de esto algunos componentes activos, tales como antisépticos, antibióticos, astringentes, sustancias anti-inflamatorias han sido formulados para el desarrollo de enjuagues bucales comerciales de uso diario (Preus et al., 2013).

Por otra parte, cabe mencionar que los aceites esenciales tienen un amplio efecto antimicrobiano contra microorganismos aerobios y anaerobios, bacterias gram positivas, gram negativas, levaduras y hongos (Rode Sde et al., 2012) capaces

también de penetrar más profundamente en la biopelícula (Marchetti et al., 2011; Rode Sde et al., 2012). Por lo tanto, estos productos naturales representan un enfoque interesante en el procesamiento de agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones, convirtiéndose en agentes seguros para la salud humana (Nostro et al., 2007).

Obtención de muestras. Con el fin de realizar los análisis de los resultados de los datos de las encuestas efectuadas a los estudiantes, la caries inicia desde temprana edad con una mala higiene de la cavidad oral, además de la dieta en general (Celik et al., 2012). Luego de completar el estudio, la edad promedio de los voluntarios fue de $x \pm 19,85$ años, este valor es similar a los reportes de la literatura quienes exponen que la caries es una enfermedad según estudios epidemiológicos que afecta a adolescentes y adolescentes adultos (Taubman et al., 2005; García et al., 2009).

Por lo anterior, un desequilibrio en la microflora oral puede ser influenciada por el metabolismo de los carbohidratos fermentables de la dieta y la higiene oral, los cuales son uno de los factores de riesgo asociados con la incidencia de la caries y la formación de biopelícula oral, la cual es representada dentro del grupo estudiado en un 93,10% (Yano et al., 2012; Al-Dajani y Limeback, 2013). Además en este estudio fue encontrado que un 4,62%, presenta antecedentes de gingivitis, la cual claramente se convierte en una afección inflamatoria superficial por depósitos de placa en los tejidos gingivales debido a la insuficiencia de

procedimientos de higiene oral, por esta razón, si no hay un control de la biopelícula oral pueden generarse enfermedades crónicas que pueden provocar la pérdida de los dientes (Eberhard et al., 2013).

En la Tabla 4 se presenta el resumen de la frecuencia de consumo de carbohidratos vs antecedentes de enfermedades orales en los estudiantes de la Universidad de Cartagena.

Tabla 4. Interpretación de resultados de frecuencia de consumo de carbohidratos vs antecedentes de enfermedades orales en los estudiantes de la Universidad de Cartagena.

Antecedentes de Enfermedades Orales en los estudiantes de la UdC					
Frecuencia de Consumo de carbohidratos	Caries	Caries y Gingivitis	Gingivitis	Ninguna	Total (%)
Diario	54	3	3	5	65
	83,08%	4,62%	4,62%	7,69%	100,00%
	93,10%	75,00%	100,00%	100,00%	92,86%
Semanal	4	1	0	0	5
	80,00%	20,00%	0,00%	0,00%	100,00%
	6,90%	25,00%	0,00%	0,00%	7,14%
TOTAL	58	4	3	5	70
	82,86%	5,71%	4,29%	7,14%	100,00%
	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Análisis microbiológico de la saliva. Los resultados de esta investigación estuvieron basados en la comparación de la efectividad del enjuague bucal natural con un enjuague bucal comercial mediante el tratamiento de dos concentraciones

al 5 %. Los resultados de esta comparación fueron similares, dato que se confirma por la presencia de aceites esenciales en el enjuague bucal comercial, en donde uno de los componentes naturales fue el aceite esencial de eucalipto, seguido de mentol y timol, los cuales los convierten en agentes que pueden inhibir el crecimiento microbiano (Bagan et al., 2012).

A pesar de lo anterior, efectos adversos han sido registrados por parte de algunos componentes de los enjuagues bucales comercialmente disponibles, siendo tóxicos y dañinos para el ser humano, encontrándose dentro de estos el etanol, salicilato de metilo, poloxamer 407, clorhexidina, entre otros (Rode Sde et al., 2012; Bagan et al., 2012). Tal es el caso del etanol, el cual es utilizado como disolvente de los agentes activos de muchos enjuagues comerciales disponibles, con concentraciones de 6% a 26,9%, lo que lleva a generar alteraciones en la mucosa oral con descamación del epitelio, úlceras, petequias y gingivitis después de usar estos enjuagues bucales, de igual manera se ha señalado que el uso diario de enjuagues bucales que contengan alcohol puede ser una causa independiente de cáncer (Bagan et al., 2012; Preus et al., 2013).

La Clorhexidina además de ser considerada como la “Gold estándar” por su acción antimicrobiana, presenta efectos secundarios como la pigmentación de los dientes, alteración del gusto, tejidos blandos y la formación de cálculo supragingival limitando su uso continuo (Marchetti et al., 2011; Rode Sde et al., 2012).

Finalmente, el enjuague bucal natural y sus ingredientes activos los aceites esenciales de *L. origanoides* y *M. piperita* presentan propiedades antimicrobianas, siendo el timol y carvacrol los principales componentes responsables de esta actividad. Además de una excelente actividad antimicrobiana frente a los patógenos involucrados en el proceso de la caries dental, convirtiéndose así como agentes prometedores en el tratamiento de enfermedades orales y otras infecciones (Rasooli et al., 2008; Vicuña et al., 2010; Lobo et al., 2011).

En este estudio la actividad antimicrobiana del enjuague bucal natural a una concentración del 10% presentó diferencias significativas comparadas con el control y el enjuague bucal comercial (Figura 11).

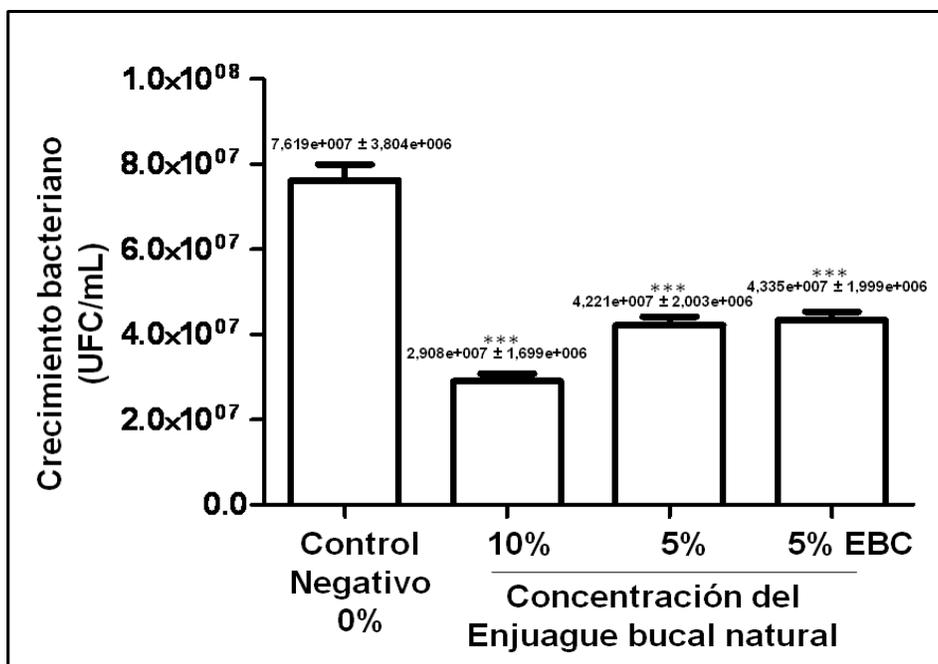


Figura 11. Representación gráfica del recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) después del tratamiento de la saliva en las concentraciones de 10%, 5% del enjuague bucal y 5% del enjuague bucal comercial. *. Diferencias significativas ($p < 0.05$) comparadas con el control negativo 0%.

4.4 Etapa IV. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima inhibitoria del enjuague bucal natural fue determinada según el método de microdilución en caldo y es definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento microbiano visible (Budzyńska et al., 2011). En esta etapa, cuatro (4) concentraciones del enjuague bucal natural fueron evaluadas frente a bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175) y bacterias gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853) (Işcan et al., 2002).

La actividad antimicrobiana en las concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, demostraron un grado de actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* (Figura 12), un patógeno oportunista que causa infecciones graves y potencialmente mortales en pacientes inmunodeprimidos (Bachir y Benali, 2012). Estos resultados son comparados con el efecto de otros aceites esenciales tales como: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* y *Rosmarinus officinalis* que muestran una actividad antimicrobiana del 40% frente a los microorganismos estudiados, además de la actividad antimicrobiana de *M. piperita* en un 2.56% frente a *S. aureus* y de *L. origanoides* en un 42,1%. (Işcan et al., 2002; Armando y Rahma, 2009; Ramirez et al., 2009; Solórzano y Novales, 2012).

Es importante mencionar que *M. piperita* y *L. origanoides* son ricos en timol y carvacrol, donde este último tiene efectos específicos sobre *S. aureus* en la viabilidad de la biopelícula (Solórzano y Novales, 2012).

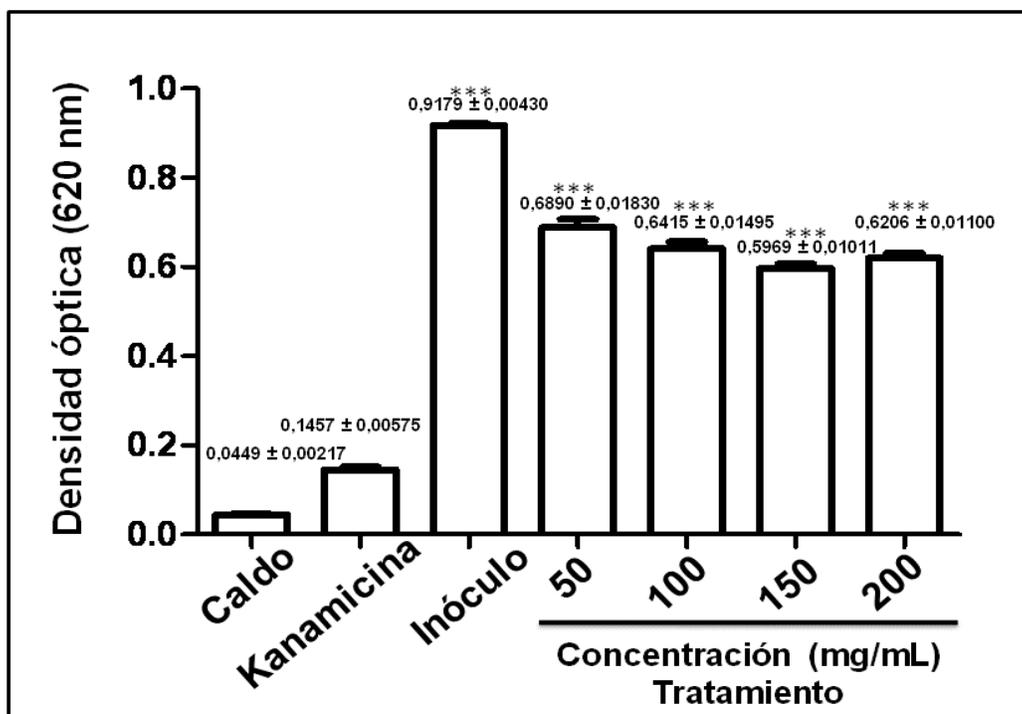


Figura 12. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *S. aureus* ATCC 25923, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal natural. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/mL), inóculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton.

Así mismo, *S. mutans* fue inhibido moderadamente entre las concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL del enjuague bucal natural (Figura 13), en donde los constituyentes de estos aceites utilizados tienen una excelente actividad antimicrobiana contra patógenos implicados en el proceso de la caries dental (Lobo et al., 2011). Ambas sustancias parecen hacer permeable la membrana de las células (Burt, 2004). Estos resultados son similares a otros trabajos que han investigado la actividad antimicrobiana de aceites esenciales como *Rosmarinus officinalis*, *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* sobre microorganismos patogénicos

de la cavidad oral, de los cuales muestran una inhibición a bajas concentraciones de 0.8% y 1.4% (Alviano y Alviano, 2009; Bernardes et al., 2010; Lobo et al., 2011).

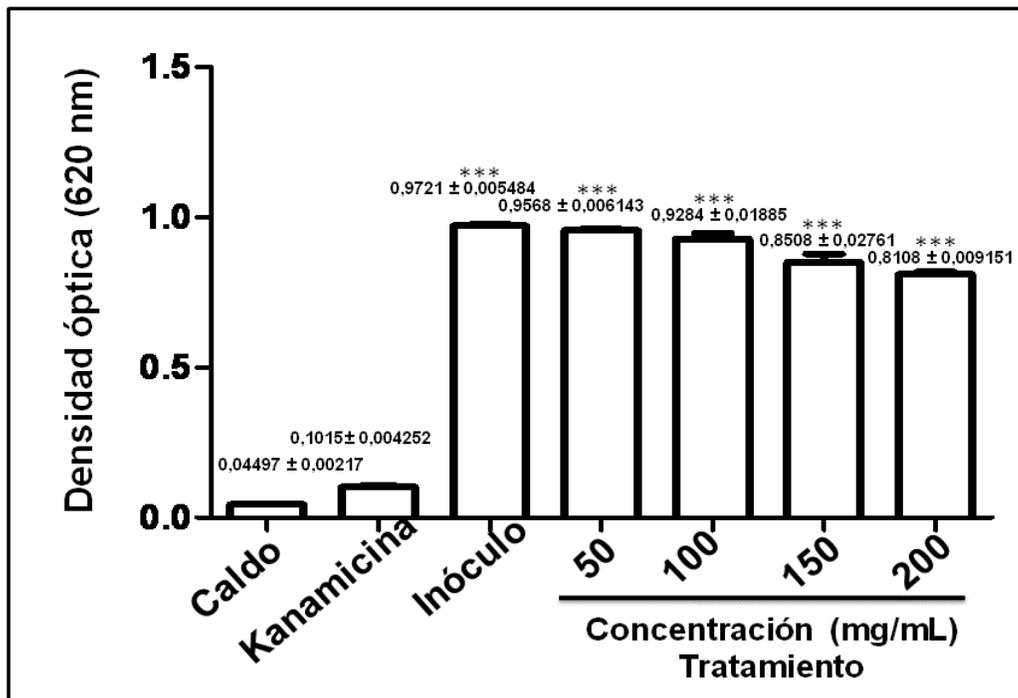


Figura 13. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *S. mutans* ATCC 25175, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal natural. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/mL), inóculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton.

Por otra parte *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* también son considerados agentes importantes en las infecciones nosocomiales, con este último patógeno más frecuentemente asociado con las infecciones oportunistas (Solórzano y Novales, 2012). Por lo tanto, los resultados de este estudio mostraron que en estos microorganismos no hubo inhibición al ser tratados con las concentraciones de 50

mg/mL a 150 mg/mL del enjuague bucal natural (Figura 14 y 15), esto puede atribuirse a que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus derivados, por lo general es más pronunciada contra las bacterias gram positivas que contra las bacterias gram negativas, lo cual puede explicarse por la presencia de su membrana fosfolipídica externa, casi impermeable a los compuestos lipofílicos (Alviano y Alviano, 2009).

La ausencia de esta barrera en las bacterias gram positivas permite el contacto directo de los aceites esenciales constituyentes hidrófobos con la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular donde provocan efecto, causando un aumento de iones de permeabilidad y la fuga de componentes intracelulares vitales, o deterioro de los sistemas de enzimas bacterianas (Alviano y Alviano, 2009).

Por otro lado, al aumentar la concentración al 200 mg/mL puede observarse actividad inhibitoria de estos microorganismo, resultado que se ha visto en otros estudios con el uso de una concentración >10,24% del aceite *L. origanoides* puede tener actividad inhibitoria sobre estos patógenos (Ramirez et al., 2009).

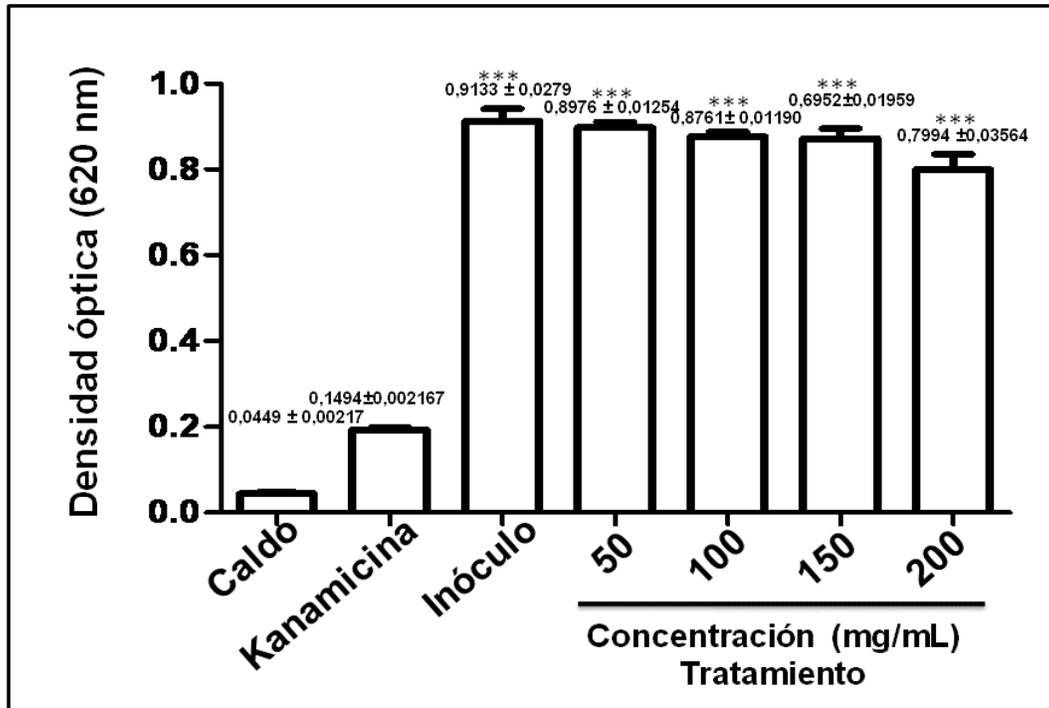


Figura 14. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *K. pneumoniae* ATCC 13883, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) Vs concentraciones del enjuague bucal natural. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/mL), inóculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton.

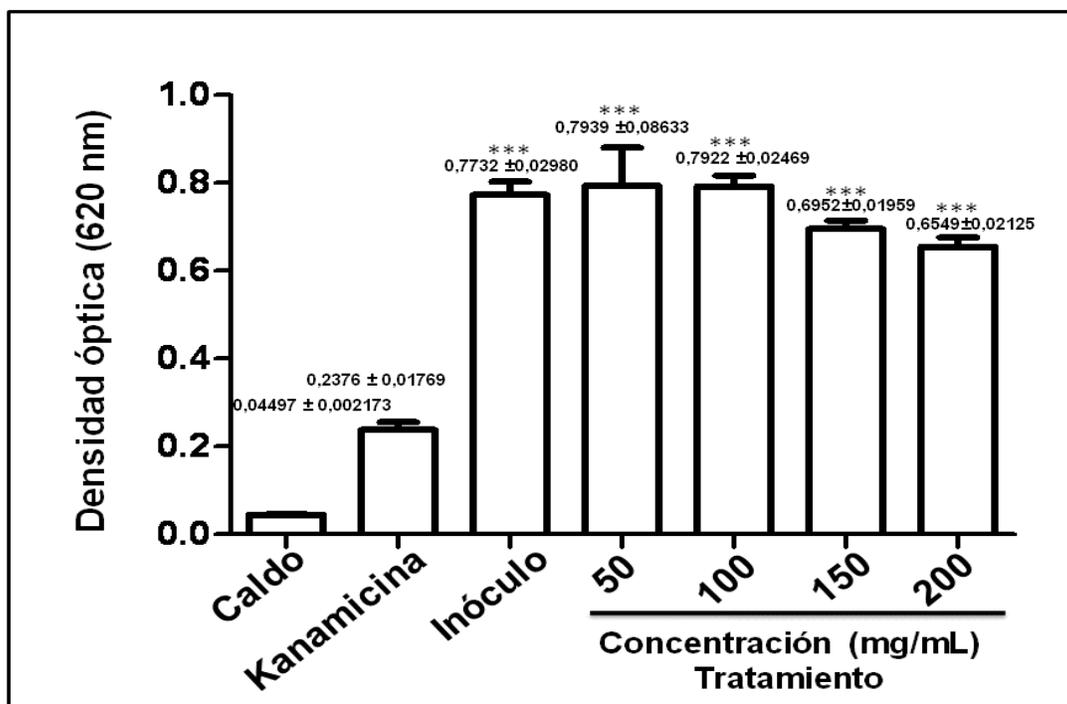


Figura 15. Concentración mínima inhibitoria de enjuague bucal natural frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, siguiendo el método de microdilución en caldo. En la gráfica se presenta la densidad óptica (620 nm) vs concentraciones del enjuague bucal natural. Controles positivos: Kanamicina (30 mg/mL), inóculo. Control negativo: Caldo Mueller Hinton.

Los enjuagues bucales han sido utilizados para diferentes fines terapéuticos y profilácticos. No obstante, ha sido difícil decidir cuál producto comercial es adecuado para un propósito en particular, debido a la las variaciones de la eficacia antimicrobiana, la citotoxicidad, entre otros. Por lo cual en los últimos años ha habido una extensa investigación para explorar y determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, así como su toxicidad y genotoxicidad. Argumentando que los efectos de estos productos naturales contra los

microorganismos pueden proporcionar una base científica para la aplicación, prevención, tratamiento y mejora de la salud dental (eliminación de la placa y gingivitis) causada por diversas bacterias patógenas (Armando y Rahma, 2009; Saxena et al., 2012).

De esta manera, estos componentes naturales tienen la posibilidad de utilizarse en productos de cuidados para la salud oral con el fin de reducir estos microorganismos patógenos en la cavidad oral (Thaweboon y Thaweboon, 2009).

5 CONCLUSIONES

El enjuague bucal preparado a partir de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Mentha piperita* presentó buenas características organolépticas.

El aceite esencial de *L. origanoides* no generó citotoxicidad frente a las células HepG2 en las concentraciones utilizadas.

El ensayo de genotoxicidad (ensayo cometa) demostró que las células HepG2 presentan baja sensibilidad a las concentraciones de *Lippia origanoides* utilizadas.

Lippia origanoides y *Mentha piperita* representan claramente especies vegetales de amplio alcance para el procesamiento de agentes terapéuticos seguros y confiables para la salud humana en el tratamiento de infecciones orales.

La actividad antimicrobiana del enjuague bucal natural comparado con el enjuague bucal comercial, muestra efectividad a una concentración del 5%.

La actividad antibacteriana del enjuague bucal natural a las concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL y 150 mg/mL utilizando el método de microdilución en caldo, demostraron un buen grado de actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*.

6 BIBLIOGRAFÍA

Armando CC, Rahma HY. 2009. Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in Mbarara district (Uganda) Rev Colombiana Cienc Anim. 1:240–249.

Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. Infect Immun.76:4259-68.

Al-Dajani M, Limeback H. 2013. Emerging science in the dietary control and prevention of dental caries. J Mich Dent Assoc.95:34-8.

Alviano DS, Alviano CS. 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. Curr Pharm Biotechnol. 10:106-21.

André RF, Andrade IM, Silva-Lovato CH, Paranhos H de F, Pimenta FC, Ito IY. 2011. Prevalence of *mutans streptococci* isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. Braz Dent J.22:62-7.

Arthur FH, Fontenot EA, Campbell JF. 2011. Evaluation of catmint oil and hydrogenated catmint oil as repellents for the flour beetles, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. J Insect Sci. 11:128.

Bagan JV, Vera-Sempere F, Marzal C, Pellín-Carcelén A, Martí-Bonmatí E, Bagan L. 2012. Cytological changes in the oral mucosa after use of a mouth rinse with alcohol. A prospective double blind control study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 17:e956-61.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils--a review. Food Chem Toxicol. 46:446-75.

Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. 2009. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. Infect Immun. 77:3696-704.

Barbalho SM, Damasceno DC, Spada AP, da Silva VS, Martuchi KA, Oshiiwa M, Machado FM, Mendes CG. 2011. Metabolic Profile of Offspring from Diabetic Wistar Rats Treated with *Mentha piperita* (Peppermint) Evid Based Complement Alternat Med.:430237.

Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Your tee DM. 1995. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr

release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. Dent Mater.11:327-31.

Belibasakis GN, Meier A, Guggenheim B, Bostanci N. Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells. 2011. Microb Pathog. 50:6-11.

Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Flauzino LG, Souza MG, Turatti IC, Andrade e Silva ML, Martins CH, da Silva Filho AA, Cunha WR. 2010. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. Z Naturforsch C.65:588-93.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. 2011. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. Fertil Steril. 5:1452-7.

Botelho MA, Bezerra Filho JG, Correa LL, Fonseca SG, Montenegro D, Gapski R, Brito GA, Heukelbach J. 2007. Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. J Appl Oral Sci. 15:175-80.

Botelho MA, dos Santos RA, Martins JG, Carvalho CO, Paz MC, Azenha C, Ruela RS, Queiroz DB, Ruela WS, Marinho G, Ruela FI. 2009. Comparative effect of an

essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. *Phytother Res.* 23:1214-9.

Bowen WH, Koo H. 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 45:69-86.

Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Różalska B. 2011. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol.*60:35-41.

Burlinson B. 2012. The in vitro and in vivo comet assays. *Methods Mol Biol* 817: 143-163.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.*94:223-53.

Caballero K, Olivero J, Stashenko E. 2012. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research.*50:62-65.

Cabarcas-Montalvo M, Olivero-Verbel J, Corrales-Aldana H. 2012. Genotoxic effects in bloodcells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. *Sci Total Environ.*416:208-14.

Cantekin K, Gurbus T, Demirbuga S, Demirci T, Duruk G. 2012. Dental caries and body mass index in a sample of 12-year-old eastern Turkish children. *Journal of Dental Sciences*, 7: 77-80.

Celik EU, Gokay N, Ates M. 2012. Efficiency of caries risk assessment in young adults using Cariogram. *Eur J Dent* Jul6:270-9.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23:143–51.

Cortelli SC, Cortelli JR, Aquino DR, Costa FO. 2010. Self-performed supragingival biofilm control: qualitative analysis, scientific basis and oral-health implications. *Braz Oral Res.* 24 Suppl 1:43-54.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. 1999. *Clin Microbiol Rev.*12:564-82.

De Rapper S, Kamatou G, Viljoen A, van Vuuren S. 2013. The In Vitro Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Other Aroma-Therapeutic Oils. Evid Based Complement Alternat Med.852049.

Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. 2008. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. Curr Drug Metab 9: 1-11.

Eberhard J, Grote K, Luchtefeld M, Heuer W, Schuett H, Divchev D, Scherer R, Schmitz-Streit R, Langfeldt D, Stumpp N, Staufenbiel I, Schieffer B, Stiesch M. 2013. Experimental gingivitis induces systemic inflammatory markers in young healthy individuals: a single-subject interventional study. PLoS One.8:e55265.

Ellepola AN, Khan ZU, Chandy R, Philip L. 2011. A comparison of the antifungal activity of herbal toothpastes against other brands of toothpastes on clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Med Princ Pract. 20:112-7.

Food and Drug Administration, HHS. 2012. Amendments to sterility test requirements for biological products. Final rule. Fed Regist.77:26162-75.

García-Cortés JO, Medina-Solís CE, Loyola-Rodríguez JP, Mejía-Cruz JA, Medina-Cerda E, Patiño-Marín N, Pontigo-Loyola AP. 2009.

Dental caries' experience, prevalence and severity in Mexican adolescents and young adults. *Rev Salud Pública (Bogotá)*. 11:82-91.

Giacaman RA, Araneda E, Padilla C. 2010. Association between biofilm-forming isolates of mutans streptococci and caries experience in adults. *Arch Oral Biol*. 55:550-4.

Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. 2012. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*.7:e47722.

Harini PM, Aneundi RT. 2010. Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: a short-term clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 28:179-82.

Hartley JM, Spanswick VJ, Hartley JA. 2011. Measurement of DNA damage in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. *Methods Mol Biol* 731: 309-320.

Horváthová E, Sramková M, Lábaj J, Slamenová D. 2006. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro Endocrinol Lett*. 2:44-7.

Huang M, Meng L, Fan M, Hu P, Bian Z. 2008. Effect of biofilm formation on virulence factor secretion via the general secretory pathway in *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 53:1179-85.

Huang R, Li M, Gregory RL. 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence. 2:435-44. doi: 10.4161/viru.2.5.16140.

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol.3:12.

Ipek, Evrim, Zeytinoglu, Hulya, Okay, Sezer, Tuylu, Berrin A., Kurkcuoglu, Mine, Husnu Can Baser, K. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum oil* and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chemistry. 93:551-556.

Işcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Başer KH, Demirci F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. J Agric Food Chem. 50:3943-6.

Jaramillo Ramirez GI, Logan JG, Loza-Reyes E, Stashenko E, Moores GD. 2012. Repellents inhibit P450 enzymes in *Stegomyia (Aedes) aegypti*. PLoS One.7:e48698.

Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. 2011. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.*45:243-63.

Kapp K, Hakala E, Orav A, Pohjala L, Vuorela P, P"ussa T, Vuorela H. & Raal, A. 2013. Commercial peppermint (*Mentha x piperita* L.) teas: Antichlamydial effect and polyphenolic composition, *Food Research International*.

Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods.*1:121-6.

Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. 2007. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.*71:653-70.

Kuramitsu HK. 1993. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med.*4:159-76.

Lee RF, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res.*544:43-64.

Linossier AC, Valenzuela CY, Soler ER, Contreras EM. 2011. [Colonization of the oral cavity by group mutans streptococci according to age assessed by a semi-quantitative method in saliva]. Rev Chilena Infectol.28:230-7.

Liu ZH, Zeng S. 2009. Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes.Toxicol Lett.187:131-6.

Lobo PL, Fonteles CS, de Carvalho CB, do Nascimento DF, da Cruz Fonseca SG, Jamacaru FV, de Moraes ME. 2011. Dose-response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. Phytomedicine. 18:551-6.

Lodhia MH, Bhatt KR, Thaker VS. 2009. Antibacterial activity of essential oils from palmarosa, evening primrose, lavender and tuberose. Indian J Pharm Sci. 71:134-6.

Mannaa A, Carlén A, Campus G, Lingström P. 2013. Supragingival plaque microbial analysis in reflection to caries experience. BMC Oral Health. 8:13:5.

Marcelis K, Dekeyser C, Declerck D, Quirynen M. 2010. [Mouthwashes: the supply in Belgium reviewed on the basis of recent literature]. Rev Belge Med Dent (1984).65:12-38.

Marchetti E, Mummolo S, Di Mattia J, Casalena F, Di Martino S, Mattei A, Marzo G. 2011. Efficacy of essential oil mouthwash with and without alcohol: a 3-day plaque accumulation model. *Trials*. Dec 15;12:262.

Marsh PD. 2010. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent*. 1:11-5.

Matsui R, Cvitkovitch D. 2010. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*. 5:403-17.

Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol*. 49:893-9.

Mulyaningsih S, Youns M, El-Readi MZ, Ashour ML, Nibret E, Sporer F, Herrmann F, Reichling J, Wink M. 2010. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipe dunculata* (Schisandraceae) and its major components. *J Pharm Pharmacol*. 62:1037-44.

Naidoo D, van Vuuren SF, van Zyl RL, de Wet H. 2013. Plants traditionally used individually and in combination to treat sexually transmitted infections in northern Maputal and, South Africa: Antimicrobial activity and cytotoxicity. *J Ethnopharmacol*.

Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. 2005. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Sci.47:59-64.

Nath BB, Babrekar AA, Parthasarathy B. 2005. Assessment of Cell Viability in Intact Glandular Tissue in *Chironomus ramosus* using Dye-exclusion and Colorimetric Assays. Cytotechnology. 49:59-65.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev.73:407-50.

Nostro A, Sudano Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Med Microbiol.56:519-23.

Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. 2013. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res. 47:89-102.

Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, Senpuku H. 2011. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. Appl Environ Microbiol.77:1572-80.

Oliveira R Danilo, Leitão Gilda G, Bizzo Humberto R, Lopes Daí'se, Alviano Daniela S, Alviano Celuta S, Leitão Suzana G. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry. 101(236-240).

Olivero J, Caballero, K, Jaramillo B, Stashenko, E. 2009. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud.41 (244-250).

Ouedraogo M, Baudoux T, Stévigny C, Nortier J, Colet JM, Efferth T, Qu F, Zhou J, Chan K, Shaw D, Pelkonen O, Duez P. 2012. Review of current and "omics" methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. J Ethnopharmacol Apr 10;140:492-512.

Oyanagi T, Tagami J, Matin K. 2012. Potentials of mouthwashes in disinfecting cariogenic bacteria and biofilms leading to inhibition of caries. Open Dent J. 6:23-30.

Pidamale R, Sowmya B, Thomas A, Jose T, Madhusudan KK, Prasad G. 2012. Association between early childhood caries, streptococcus mutans level and

genetic sensitivity levels to the bitter taste of, 6-N propylthiouracil among the children below 71 months of age. *Dent Res J (Isfahan)*.9:730-4.

Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*.6:39.

Preus HR, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, Hansen BF. 2013. The plaque- and gingivitis-inhibiting capacity of a commercially available essential oil product. A parallel, split-mouth, singleblind, randomized, placebo-controlled clinical study. *Acta Odontol Scand*.

Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X. 2010. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*.76:5846-51.

Ramirez, LS Stella et al. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. *Ciencia [online]*. 2009. vol.17, n.4 [citado 2013-07-01], pp. 313-321.

Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SD. 2008. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother Res*.22:1162-7.

Revay EE, Junnila A, Xue RD, Kline DL, Bernier UR, Kravchenko VD, Qualls WA, Ghattas N, Müller GC. 2013. Evaluation of commercial products for personal protection against mosquitoes. *Acta Trop.* 125:226-30.

Riley BS, Li X. 2011. Quality by design and process analytical technology for sterile products--where are we now? *AAPS PharmSciTech.*12:114-8.

Rode Sde M, Gimenez X, Montoya VC, Gómez M, Blanc SL, Medina M, Salinas E, Pedroza J, Zaldivar-Chiapa RM, Pannuti CM, Cortelli JR, Oppermann RV. 2012. Daily biofilm control and oral health: consensus on the epidemiological challenge - Latin American Advisory Panel. *Braz Oral Res.*26:133-43.

Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. 2012.

Schlafer S, Raarup MK, Meyer RL, Sutherland DS, Dige I, Nyengaard JR, Nyvad B. pH landscapes in a novel five-species model of early dental biofilm. 2011. *PLoS One.* 6:e25299.

Saxena S, Uniyal V, Bhatt RP. 2012. Inhibitory effect of essential oils against *Trichosporon ovoides* causing Piedra Hair Infection. *Braz J Microbiol.* 43:1347-54.

Setzer WN. 2009. Essential oils and anxiolytic aromatherapy. *Nat Prod Commun.*4:1305-16.

Schlafer S, Raarup MK, Meyer RL, Sutherland DS, Dige I, Nyengaard JR, Nyvad B. 2011. pH landscapes in a novel five-species model of early dental biofilm. PLoS One. 6:e25299.

Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. 2013. In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. Evid Based Complement Alternat Med.2013:269161.

Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS. 2011. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). J Adv Pharm Technol Res. 2:3-8.

Shinada K, Ueno M, Konishi C, Takehara S, Yokoyama S, Zaitso T, Ohnuki M, Wright FA, Kawaguchi Y. 2010. Effects of a mouthwash with chlorine dioxide on oral malodor and salivary bacteria: a randomized placebo-controlled 7-day trial. Trials.11:14.

Shrestha A, Mohamed-Tahir M, Hegde J, Azarpazhooh A, Kishen A. 2011. Caries-risk assessment with a chairside optical spectroscopic sensor by monitoring bacterial-mediated acidogenic-profile of saliva in children. J Conserv Dent. 14:395-400.

Solórzano-Santos F, Miranda-Navales MG. 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 23:136-41.

Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A.2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.*114:785-96

Tabchoury CP, Sousa MC, Arthur RA, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Cury JA. 2008. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci.*16:403-7.

Taher.YA.2012.Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. *Libyan J Med.*7. doi: 10.3402/ljm.v7i0.16205.

Taubman M.A, Smith D.J, Kawai T, Valverde P, Han X.2005.Host–biofilm interface interactions lead to oral infectious diseases and contain promise for disease amelioration. *International Congress Series.* 1284:93-102.

Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?.2009.*Braz Oral Res.*1:39-48.

Thaweboon S, Thaweboon B.2009. In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 40:1025-33.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.

Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M.2008.The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol In Vitro*. 22:232-9.

Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot JC, Le Bon AM, Chagnon MC. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res*. 536:79-90.

Velez MT y Cuadrado B. Control microbiológico a medicamentos, cosméticos y desinfectantes. Cartagena de Indias: Editorial Universitaria. 2005.

Vicuña GC, Stashenko EE, Fuentes JL. 2010. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*. 81:343-9.

Wagner-Döbler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., *et al.* 2005. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine *alphaproteobacteria*. *Chembiochem*. 6: 2195-2206.

Wallace RJ. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. 2004. *Proc Nutr Soc*. 63:621-9.

Welin-Neilands J, Svensäter G. 2007. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*.73:5633-8.

Workman WE, Clayton RA. 1996. Microbial sterility testing of oil-formulated bovine somatotropin using Tween 80 dispersion. *J Pharm Biomed Anal*. 15:193-200.

Wu CD. Grape products and oral health. 2009. *J Nutr*. 139:1818S-23S.

Yan R, Yang Y, Zeng Y, Zou G. 2009. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. *J Ethnopharmacol*.121:451-5.

Yano A, Konno N, Imai S, Kato H.2012. Inhibitory effects of polysaccharides on the cariogenic activities of *Streptococcus mutans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 76:2313-6.

Yigit N, Aktas E, Ayyildiz A. 2008. Antifungal activity of toothpastes against oral Candida isolates Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology. 18:141-146.

Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, Ben Mansour R, Bekir A, Mejdoub H, Gharsallah N. 2011. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. Lipids Health Dis. 10:161.

Zhang Y, Wu Y, Chen T, Yao L, Liu J, Pan X, Hu Y, Zhao A, Xie G, Jia W. 2013. Assessing the metabolic effects of aromatherapy in human volunteers. Evid Based Complement Alternat Med. 356381.

7 ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE ENCUESTA PARA RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
Grupo De Investigación Química Ambiental y Computacional
Proyecto Enjuague Bucal.

Encuesta para obtención de datos variables

Nombre:

Identificación C.C.:

Código de muestra:

Edad:

Dirección:

Teléfono:

Nivel socioeconómico: Bajo: Medio: Alto:

Factores de riesgos:

Frecuencia de consumo de carbohidratos: Diario: Semanal:

Frecuencia de uso de enjuague bucal: Diario: Semanal: No usa:

Frecuencia de Lavado de dientes: Tres veces al día: Una Sola Vez al día:

Dieta: Ingesta de frutas y verduras: Diario: Semanal:

Antecedentes de enfermedades orales:

Caries:

Gingivitis:

Periodontitis:

Otros:

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PARTICIPANTES DEL PROYECTO.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Entiendo que se me ha pedido que participe como sujeto en una investigación llamada “Actividad antibacteriana del enjuague bucal a base de *Lippia origanoides* y *Mentha piperita* frente a la flora oral de estudiantes de la Universidad de Cartagena” bajo la dirección de la Doctora Bárbara Arroyo Salgado de la Universidad de Cartagena.

PROCEDIMIENTOS: Si decido participar en el estudio, una vez haya firmado el consentimiento informado, entiendo que completaré un cuestionario sobre estilo de vida y estado de salud. Las muestras serán tomadas, por profesionales calificados.

NÚMERO DE PARTICIPANTES: El número aproximado será de ___ participantes.

BENEFICIOS AL SUJETO: Entiendo que no recibiré beneficio directo por mi participación voluntaria en este estudio. Los datos del estudio serán confidenciales y no me podrán ser revelados ya que este estudio es de tipo poblacional, y no diagnóstico, y por lo tanto sus conclusiones solo serán extrapolados a la población total (12 individuos).

BENEFICIOS A LA SOCIEDAD: El beneficio a la sociedad será la socialización de los resultados del proyecto en cuanto a la utilización de productos naturales como materia prima para elaborar enjuagues bucales.

CONFIDENCIALIDAD: Entiendo que la información del cuestionario y todas las muestras serán identificadas con un código para proteger mi nombre y datos personales. Esta información será mantenida bajo estricta confidencialidad por parte de los investigadores.

CLAUSULAS ESTANDAR:

Entiendo que el consentimiento voluntario es requerido para todas las personas en este proyecto. Los procedimientos principales, incluyendo los procedimientos experimentales

han sido expuestos y me los han explicado en un lenguaje que yo puedo entender. Me han explicado los riesgos e incomodidades y beneficios del estudio. Me han ofrecido responder a todas las preguntas que yo pueda tener acerca de los procedimientos antes de ingresar al estudio. Yo tengo el derecho a la privacidad y confidencialidad de toda la información obtenida con relación a este estudio. La información obtenida de este estudio que pueda identificarme será sólo conocida por el investigador principal, quien podrá tener acceso a mis datos personales si es necesario. Los resultados de este estudio pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales ó ser publicados en revistas científicas sin identificarme por mi nombre.

Usando un lenguaje apropiado y comprensible he discutido este proyecto y los puntos anteriores con el individuo y su representante autorizado o con ambos.

Acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en el proyecto antes mencionado. Entiendo que se me dará una copia de este consentimiento.

Fecha

Firma del sujeto

Fecha

Firma del Director del Proyecto

ANEXO 3. MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

Los medios utilizados para el tratamiento de la saliva y el aislamiento cepas ATCC fueron tomados de Wan et al., 2002.

AGAR MUELLER HINTON

Infusión de carne	300g
Peptona ácida de caseína	17.5g
Almidón	1.5g
Agar	15g

CALDO MUELLER HINTON

Infusión de carne	300g
Peptona ácida de caseína	17.5g
Almidón	1.5g

CALDO Luria Bertani (LB)

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

MEDIO TYSB20

Tripticasa de soya	30g
Extracto de levadura	10g
Agar granulado	11g
Sacarosa	20g

Bacitracina 0.2U/ml

Agua destilada

AGAR PLATE COUNT

Peptona 0.5g

Extracto de levadura 0.25g

Glucosa 0.1g

Agar 1.5g

AGAR CHROMOCULT

Peptona 3 g

Cloruro sódico 5 g

Dihidrógenofosfato potásico 1,7 g

Hidrógenofosfato dipotásico 3 g

Piruvato sódico 1 g

Triptófano 1 g

Laurilsulfato sódico 0,1 g

Agar-agar 12 g

Mezcla de cromógenos 0,2 g

AGAR SABOURAUD DEXTROSA

Dextrosa 40g

Peptona	10g
Agar	20g

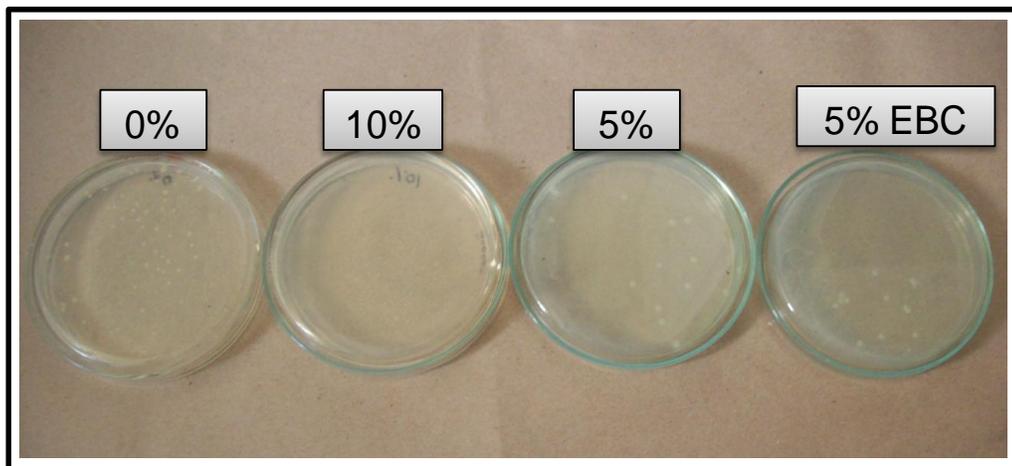
**ANEXO 4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ENJUAGUE BUCAL NATURAL
FRENTE AL TRATAMIENTO DE LA SALIVA.**



Preparación de medios de cultivo en las concentraciones del enjuague a base de aceites esenciales de *L. origanoides* y *Mentha piperita* además del enjuague bucal comercial



Siembra de muestras de saliva



Resultados de la actividad antimicrobiana del enjuague bucal a base de *L. origanoides* y *Mentha piperita*