

**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE *ESTREPTOCOCOS MUTANS*
PRESENTES EN PLACA DENTAL DE SUJETOS CON ADITAMENTOS
ORTODÓNTICOS LUEGO DE ESTAR EN CONTACTO CON UN ENJUAGUE
BUCAL DE ORIGEN VEGETAL**



Autores

LUIS EDUARDO CARMONA ARANGO
CARLOS EDUARDO GUILLEN GUERRERO
LUIS CARLOS MARZAN GENEY

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSTGRADO DE ORTODONCIA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

2013

**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE ESTREPTOCOCOS MUTANS
PRESENTES EN PLACA DENTAL DE SUJETOS CON ADITAMENTOS
ORTODÓNTICOS LUEGO DE ESTAR EN CONTACTO CON UN ENJUAGUE
BUCAL DE ORIGEN VEGETAL**

Investigador principal

LUIS EDUARDO CARMONA ARANGO

Odontólogo-Especialista en Odontopediatría

Magister en Microbiología

Docente de Pre y Postgrado - Universidad de Cartagena

Coinvestigadores

CARLOS EDUARDO GUILLEN GUERRERO

LUIS CARLOS MARZAN GENEY

Estudiantes del Postgrado de Ortodoncia Universidad de Cartagena

Asesor metodológico

FARITH DAMIAN GONZALEZ MARTÍNEZ

Odontólogo – Especialista en Investigación social

Magister en salud pública universidad Nacional de Colombia

Docente de Pre y Postgrado - Universidad de Cartagena

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSTGRADO DE ORTODONCIA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

2013

Nota de aceptación

Firma del presidente

Firma del jurado

Firma del jurado

Cartagena de Indias, 6 de Diciembre del 2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, quien nos dio la fortaleza, la energía y las ganas de superación, teniendo como base este proyecto de investigación que no solo buscaba saciar nuestras necesidades académicas, sino brindar ayuda a la comunidad.

El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión del Dr. Luis Eduardo Carmona Arango y Dr. Farith Damián González Martínez, a quienes nos gustaría expresar nuestro agradecimiento, por aportar su valioso tiempo, paciencia y conocimiento para su desarrollo exitoso.

A los directivos, docentes y pacientes de la Universidad de Cartagena, quienes en todo momento se mostraron colaboradores, amables y con disposición de brindarme su tiempo para permitir el desarrollo de las actividades de este trabajo de investigación.

No menos importantes son nuestros familiares, por ello agradecemos su apoyo incondicional, cariño, comprensión y por hacer más fácil el afrontar cada jornada de trabajo.

DEDICATORIA

Queremos dedicar este trabajo a Dios por regalarnos la vida, la oportunidad de formarnos en una prestigiosa Institución como lo es la Universidad de Cartagena y por regalarnos la fortaleza y disposición para terminar este proyecto de investigación.

A nuestros padres y demás familiares por estar ahí cuando más los necesitábamos, por sus consejos y recomendaciones en los momentos más difíciles, por ser el motor que nos impulsa a levantarnos cada día con el ánimo de avanzar y cumplir nuestros objetivos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ANEXOS	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. JUSTIFICACIÓN.....	9
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
4. MARCO TEORICO	14
4.1 CARIES DENTAL.....	17
4.2 PLACA DENTAL	19
4.3 COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS.....	20
4.2 CLORHEXIDINA	22
4.4 ACEITES ESENCIALES.....	23
5. METODOLOGÍA.....	27
5.1 TIPO DE ESTUDIO.....	27
5.2 MUESTRA.....	27
5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	27
5.3.1. Criterios de inclusión. Personas tratados con ortodoncia fija en la facultad de odontología de la universidad de Cartagena, con mínimo un mes de tratamiento, durante el periodo comprendido	

entre enero de 2011 y enero de 2013, aceptar participar en el estudio a través de la firma de un consentimiento informado y que además tengan un índice de placa mayor de 15%.....	28
5.3.2 Criterios de exclusión. Personas con enfermedad periodontal, que se estuvieran tomando algún tipo de enjuagatorio oral antibacteriano tipo clorexhidina por lo menos un mes antes de la toma de muestra, Pacientes con tratamiento ortodòntico inactivo y mujeres en estado de embarazo.....	28
5.4 VARIABLES.....	28
5.5 DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	29
5.6 RECLUTAMIENTO DE MUESTRA Y ANALISIS MICROBIOLÒGICO.....	32
5.7 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE PLACA DENTAL.....	32
5.8 ANALISIS ESTADISTICO.....	34
5.9 ASPECTOS ÈTICOS.....	34
6. RESULTADOS.....	35
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSION.....	45
9. RECOMENDACIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Distribución de las características sociodemográficas por tipo de enjuague bucal.....	35
Tabla 2. Cantidad de UFC de <i>Streptococcus mutans</i> por tipo de enjuague bucal	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto de la mezcla de aceites esenciales sobre macrófagos RAW 264,7.....	36
Figura 2. Comparación de la morfología de células de la línea RAW 264,7	37
Figura 3. Comparación de unidades formadores de colonias de <i>Streptococos mutans</i> por tipo de enjuague	39

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Consentimiento informado	53
Anexo 2. Formato de recolección de datos	55
Anexo 3. Tabla matriz	56

RESUMEN

Problema. La utilización de aditamentos en ortodoncia predisponen al acumulo de placa bacteriana, la cual causa inflamación en el periodonto y caries dental, esta última se asocian con el *Streptococcus mutans*, es por ello que se deben contar con herramientas que ayuden a controlar la formación de placa y reduzcan la virulencia de este microorganismo.

Objetivo. Evaluar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* presentes en placa dental de sujetos con aditamentos ortodónticos luego de estar en contacto con un enjuague bucal de origen vegetal en comparación con un enjuague bucal con clorhexidina.

Metodología. Mediante un ensayo clínico se seleccionaron 48 participantes de la clínica de ortodoncia de la Universidad de Cartagena, teniendo en cuenta la presencia de placa dental. Los participantes fueron asignados en forma aleatoria para recibir dos tipos de enjuagues bucales (23 recibieron enjuague a base de Aceites esenciales y los otros 23 recibieron Clorhexidina) colocado en el aditamento más distal por 15 días, 2 participantes fueron incluidos en el grupo control, posteriormente se realizó la recolección de la placa y se cultivó en un medio selectivo para *Streptococcus mutans*, luego del proceso de incubación se procedió a realizar el conteo de UFC de *Streptococcus mutans*. Para comparar la cantidad de UFC en los

tres grupos se utilizó el test de ANOVA, teniendo en cuenta un límite de significancia menor de 0.05.

Resultados. Se presentó una media general de 6,91 (DE=0,66) UFC de *Streptococos mutans*, para el grupo A (Clorhexidina) la media fue de 6,81 (DE=0,72) UFC y para el grupo B (Aceites esenciales) de 6,96 (DE=0,59) UFC; en el grupo control fue de 7,45 (DE=0,13) UFC. Al comparar los grupos no se encontró diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones. No existen diferencias significativas entre el uso de Clorhexidina y Aceites esenciales para el control microbiano de la cavidad bucal en participantes con ortodoncia. Se sugiere que los aceites esenciales son alternativas en la reducción de la colonización de *Streptococos mutans* en la placa dental, al presentar un comportamiento similar a la clorhexidina.

Palabras clave. *Streptococos mutans*, Aceites esenciales, ortodoncia.

INTRODUCCIÓN

En el tratamiento de ortodoncia la presencia de aditamentos predisponen al acumulo de placa bacteriana, lo cual es un factor preponderante en la presencia de inflamación en el periodonto y caries dental. Las lesiones cariogénicas se asocian con el microorganismo *Streptococcus mutans* considerándose el más patógeno, es por ello que se deben contar con herramientas que ayuden a controlar la formación de placa y reduzcan la virulencia de este microorganismo, de esta manera se proporcionan las condiciones óptimas de salud oral durante el desarrollo de esta terapéutica.

La acumulación de placa es una de las causas que dificulta que el tratamiento se lleve a cabo de manera adecuada y en el tiempo programado, predispone a la aparición de lesiones desmineralizadas; siendo fundamental el control de placa supragingival y subgingival, para evitar lesiones iatrogénicas. Por ello para conseguir buenos resultados es muy importante enseñarlos a mantener una salud bucal adecuada y facilitarles la higiene proporcionándoles productos que tengan lo necesario para poder prevenir este tipo de problemas.

Entre estos productos se encuentran los enjuagues bucales o aceites esenciales los cuales ejercen un control sobre la cantidad de microorganismos presente en la

placa bacteriana. Por esto el conocimiento del mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre los microorganismos presentes en la placa bacteriana que se aloja en los aditamentos fijos de los pacientes con ortodoncia es indispensable para que se pueda establecer qué papel tiene la aparatología ortodóntica con el acumulo de placa y a su vez con la cantidad de bacterias presentes en esta después del uso de un enjuague bucal.

En este trabajo de investigación se compara la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* en placa de individuos con ortodoncia a través de un ensayo clínico, donde se utilizaron medios de cultivos selectivos para este microorganismo, por medio del cual se logra evaluar las UFC de *Streptococcus mutans* presentes en placa dental de sujetos con aditamentos ortodónticos luego de estar en contacto con un enjuague bucal de origen vegetal en comparación con un enjuague bucal con clorhexidina.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la ortodoncia proporciona la utilización de diferentes técnicas con la presencia de aditamentos que van aportando mayor facilidad para el manejo de los movimientos ortodónticos; sin embargo, se ha sugerido que estos aditamentos ortodonticos producen un cambio o aumento de la micro flora oral y acumulación de placa bacteriana, al igual que podrían influir en la higiene del paciente, de ahí se debe conocer a fondo los beneficios y riesgos a los que se someten los pacientes colocándose ese tipo de aparatología¹.

La placa dentobacteriana es el soporte de un microsistema de bacterias que acumula una variedad de características fisiológicas. En particular, la producción de ácidos resulta del metabolismo del azúcar, esas bacterias disminuyen el pH y son responsables de la desmineralización de la superficie del esmalte. Se considera además un depósito de microorganismos firmemente adheridos a las superficies dentales o asociados con las estructuras de soporte, organizados, bioquímicamente activos, de apariencia rugosa y coloración blanquizca o amarillenta, de espesor variable, hasta de varias micras².

En la formación de la película dental juega un papel importante las glicoproteínas de origen salival, que se adhieren a las superficies duras entre ellas el esmalte dental y

¹TAKAHASHI, N; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. En: Caries Res 2008, vol. 42, n^o.6, p. 409–418.

² FAN, M. Detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus on the Permanent First Molars of the Mosuo People in China. En:Original Paper 2003, vol. 10, n^o.5, p. 374–80.

los diversos aditamentos ortodonticos, estas posibilitan la adhesión bacteriana, células del huésped y restos alimenticios, los cuales sirve a la vez de sustrato para el metabolismo bacteriano³.

Dentro de la placa bacteriana se dan algunos procesos como es la proliferación, agregación y coagregación bacteriana, que permite en el tiempo su maduración, estadio en el cual, la placa causa caries y enfermedad periodontal⁴. La caries dental que es una de las enfermedades más difundidas de la humanidad, y un alto porcentaje de la población mundial es afectada en diferentes edades de su vida lo cual esta enfermedad se considerada un problema de salud pública^{5,6}.

En cuanto a la caries dental se dice que es una enfermedad multifactorial que destruye los tejidos duros del diente. Es una enfermedad compleja que se expresa como una interacción de varios factores, incluyendo el huésped, el agente, el sustrato y el tiempo. Algunos conceptos modernos consideran a la caries como una interacción entre factores genéticos y ambientales en las que los factores sociales, conductuales, psicológicos y biológicos se expresan de una manera interactiva. Los mas importante en la comprensión del proceso de la caries, es que esta no se

³ PASICH, E; WALCZEWSKA, M; PASICH, A; MARCINKIEWICZ, J. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. En: Postepy Hig Med Dosw. 2013, vol. 67, n^o. 14, p.736-41.

⁴ MANNAA, A; CARLÉN, A; CAMPUS, G; LINGSTRÖM, P. Supragingival plaque microbial analysis in reflection to caries experience. En: BMC Oral Health. 2013, vol. 13, n^o.5, p. 5-10.

⁵ FRAZÃO P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. En: Braz Oral Res. 2012, vol.26, n^o. 1, p.108-14.

⁶ COSTA, M; ABREU, MH; VASCONCELOS, M; LIMA, C; VERDI, M; FERREIRA, EF. Inequalities in the distribution of dental caries in Brazil: a bioethical approach. En: Cien Saude Colet. 2013, vol. 18, n^o. 2, p. 461-70.

produce en ausencia de placa dental o hidratos de carbono fermentables en la dieta, por lo tanto se considera una enfermedad dieto bacteriana^{7,8}.

Unos de los microorganismos que se a podido determinar en la micro flora oral y que tiene gran responsabilidad como agente etiológico y desarrollo de la caries es el *Streptococcus mutans*; siendo un foco de atención para la prevención de esta enfermedad a través de la utilización de sustancias antimicrobianas⁹.

Estos antimicrobianos han contribuido con la disminución de la prevalencia de la caries; sin embargo, se han reportado la presencia de efectos colaterales como cambios en la flora bacteriana de la cavidad oral y del tracto digestivo, desarrollado resistencia bacteriana. Además, se pueden presentar tinciones extrínsecas sobre los dientes y la lengua; la cantidad de tinción puede depender de la concentración y varía de un individuo a otro. La tinción puede aparecer sobre los dientes naturales, artificiales y sobre restauraciones con resinas¹⁰.

⁷ USHA, C. Dental caries - A complete changeover (Part I). En: J Conserv Dent. 2009, vol.12, n°.2, p. 46-54.

⁸ SHIVAKUMAR, K; PRASAD, S; CHANDU, G. International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries. En: J Conserv Dent. 2009, vol. 12, n°. 1, p.10-6.

⁹ WANG, ZY; WANG, JQ; ZHOU, Y; ZHAO, D; XIAO, B. Quantitative detection of Streptococcus mutans and bacteria of dental caries and no caries groups in permanent teeth from a north China population. En: Chin Med J (Engl). 2012, vol. 125, n°. 21, p. 3880-4.

¹⁰ NAYAK, SS; ANKOLA, AV; METGUD, SC; BOLMAL, U. Effectiveness of mouthrinse formulated from ethanol extract of Terminalia chebula fruit on salivary Streptococcus mutans among 12 to 15 year old school children of Belgaum city: a randomized field trial. En: J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2012, vol. 30, n°. 3, p. 231-6.

La clorhexidina ha sido el más usado y potente de todos los antimicrobianos; es un agente que actúan sobre la placa bacteriana, eliminando los microorganismos que la forman, inhibiendo la formación de la matriz de la placa y eliminando la placa formada. Se usa a concentraciones de 0,12%, 0,2% y al 0.05%, es bacteriostático y bactericida. Actúa sobre el *Streptococcus mutans* y la *Candida albicans*, tiene una sustentividad de 7-12 horas¹¹.

El uso indiscriminado de antimicrobianos es actualmente un riesgo para la salud debido a la resistencia de algunos microorganismos a los antibióticos convencionales y a los conservantes sintéticos utilizados en la Industria alimentaria, que en numerosos informes son considerados como responsables de ser cancerígenos y teratogénicos por su toxicidad residual. Por esta causa, ha aumentando la tendencia al uso de conservantes naturales, que han llegado a constituir una alternativa promisoriosa como fuente de sustancias con actividad antimicrobiana¹².

Teniendo en cuenta que además de que en esta comunidad existen diversos paradigmas acerca del tratamiento adecuado para la caries dental; es cierto que muchas de estas medidas no son asequibles para una gran parte de la población

¹¹ PAPAS, AS; VOLLMER, WM; GULLION, CM; BADER, J; LAWS, R; FELLOWS, J. Efficacy of chlorhexidine varnish for the prevention of adult caries: a randomized trial. En: J Dent Res. 2012, vol. 91, n°. 2, p.150-5.

¹² CASTAÑO, H; CIRO, G; ZAPATA, J; JIMÉNEZ S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. En: Vitae 2010, vol. 17, n°. 2, p.149-154.

que padece de esta enfermedad, ya que muchas de estas medidas se basan en una intervención odontológica profesional de la cual no siempre se cuenta en poblaciones de bajos recursos o rurales que constituyen focos de alta prevalencia de dicha enfermedad. El poder adquisitivo de algunas personas también constituye un impedimento para contar con aquellas alternativas terapéuticas farmacológicas que se desarrollan con la finalidad de combatir las enfermedades dentales, considerando además que el plan obligatorio de salud no cubre su tratamiento.

Por estas consideraciones, está la necesidad de buscar nuevas fuentes de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades orales de origen bacteriano; que sean efectivas, económicas y de fácil acceso para la comunidad en general, además conociendo la biodiversidad de plantas presentes en Colombia con propiedades farmacológicas, es necesaria su utilización para la búsqueda de agentes terapéuticos alternativos.

Por tal motivo es pertinente evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales procedente de las plantas *Elettaria cardamomum* L (Cardamomo), *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto), *Citrus reticulata* L (Mandarina), *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Clavo de olor) y *Ocimum basilicum* L (Albahaca), contra el microorganismo *Streptococcus mutans* y determinar la eficacia de estos aceites en los

tratamientos de ortodoncia por medio de la determinación de unidades formadoras de colonias.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es la cantidad de UFC de *Streptococos mutans* presentes en placa dental de sujetos con aditamentos ortodónticos luego de estar en contacto con un enjuague bucal de origen vegetal en comparación con un enjuague bucal con clorhexidina?

2. JUSTIFICACIÓN

Es necesario conocer la microflora que se desarrolla en la cavidad oral y los diferentes microorganismos que se encuentran con frecuencia, sus características, su mecanismo de acción, grado de contaminación y así determinar la etiología de las diferentes enfermedades que se encuentran en boca.

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes en la humanidad, cerca del 95% de la población mundial es afectada en diferentes edades de su vida, convirtiéndose en un problema de salud pública; su desarrollo está mediado por la presencia de placa. Teniendo en cuenta que los aditamentos utilizados en ortodoncia aumentan el acumulo de placa, esto puede ocasionar un cambio en el ambiente oral produciendo un desequilibrio y un aumento cuantitativo y cualitativo de la flora microbiana. Este fenómeno ocasiona una migración de microorganismos al flujo sanguíneo donde primero produce daños locales y segundo puede involucrar órganos vitales. Entonces sería menester tener en cuenta los aditamentos utilizados durante el tratamiento ortodóntico, ya que estos favorecen a la formación de placa bacteriana tanto la supragingival como la infragingival y aumentan la acumulación de restos de comida y dificultad en el aseo diario, estos restos al no ser removidos adecuadamente ocasionan daño en el hospedero. Estos cambios se manifiestan clínicamente debido a los diferentes factores de patogenicidad de los agentes como inflamación, sangrado gingival y microbios presentes en placa y posterior penetración

de microorganismos por vía sanguínea, por los capilares rotos y puede ocasionar desde una bacteremia transitoria a una septicemia mortal¹³.

Pero, si se educa al paciente para el control de la placa microbiana por medio de los colutorios o enjuagues bucales específicos se puede monitorear y reducir este proceso durante el periodo que dure el tratamiento y disminuir el riesgo en cavidad oral de estos microorganismos, evitar descalcificación del esmalte, caries dental, gingivitis y periodontitis que se va a traducir a efectos positivos a favor de un adecuado tratamiento ortodóntico.

En una investigación realizada por Pandis¹⁴ donde comparaban los diversos aditamentos utilizados en aparatología fija ortodóntica observaron que en las ligaduras elásticas y metálicas hay un incremento significativo del número de colonias de *Streptococcus mutans* y lactobacilos en el flujo salival.

En otro estudio donde observaron que los dientes que estaban atados a ligaduras elásticas a los arcos tenían un mayor número de microorganismo q los ligados con

¹³ ATTIN, R; THON, C; SCHLAGENHAUF, U; WERNER, C; WIEGAND, A; HANNIG, C; ATTIN, T. Recolonization of mutans streptococci on teeth with orthodontic appliances after antimicrobial therapy. En: Eur J Orthod. 2005; vol.27, n^o.5, p.489-93.

¹⁴ PANDIS, N; PAPAIOANNOU, W; KONTOU, E; NAKOU, M; MAKOU, M; ELIADES, T. Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. En: Eur J Orthod. 2010; vol. 32, n^o.1, p.94-9.

metálica y recomendaron limitar el uso de los aditamentos tipo ligadura elástica para aquellos pacientes que tengan un mal control de placa microbiana¹⁵.

Existen diferencias significativas entre las cantidades de placa que se puedan encontrar en diversos hábitat en la cavidad oral dentro del ecosistema bucal encontraron el dorso de la lengua, la mucosa bucal, y surco gingival, y diferentes zonas dentales como fosas y fisuras y determinadas superficies lisas, estos hábitats presentan unas condiciones ambientales únicas y albergan comunidades de microorganismos con diferencias muy marcadas.

En otro estudio demuestran que el entorno oral con aparatología ortodóntica fija propician las condiciones para la colonización de microorganismos y los pacientes tienen dificultad para mantener la adecuada higiene oral y la aparatología proporciona sitios adicionales para la aglutinación de bacterias. Existen muchos factores dentro del tratamiento ortodóntico que influyen en la formación de la placa bacteriana que se formará en los tipos de brackets que se utilizan y también en los materiales de adhesión de la aparatología ortodóntica, también aditamentos coadyuvantes como son cadenetras, ligaduras plásticas, metálicas y elásticos¹⁶.

¹⁵ MOTA, SM; ENOKI, C; ITO, IY; ELIAS, AM; MATSUMOTO, MA. Streptococcus mutans counts in plaque adjacent to orthodontic brackets bonded with resin-modified glass ionomer cement or resin-based composite. En: Braz Oral Res. 2008; vol.22, n^o.1, p.55-60.

¹⁶ COSTA, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. En: Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; vol. 22, n^o.5, p.299-305.

En otro estudiaron el efecto de agentes antimicrobianos, fluoruro de sodio, clorhexidina y xilitol sobre las biopelículas orales formadas en los dispositivos ortodónticos. Los agentes antimicrobianos fueron capaces de difundir dentro de la biopelícula, modificar su estructura haciéndola más compacta, reducir el crecimiento de las bacterias sésiles, reducir el desprendimientos de la biopelícula esto podría ocurrir bajo mayores condiciones ambientales cuando finaliza el tratamiento¹⁷.

Por eso se cree que existen gran número de tratamientos por aparatología fija ortodóntica que fracasan o se retrasan por la complicación periodontales, por eso es útil estudiar e identificarlos diferentes nicho ecológicos de la placa bacteriana y así brindarle a los pacientes un tratamiento con menos complicaciones más seguro y eficientes.

¹⁷ HATA S, HATA H, MIYASAWA-HORI H, KUDO A, MAYANAGI H. Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. En: Journal compilation The Society for Applied Microbiology. 2006; vol. 42, n^o.3, p. 127–131.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las UFC de *Streptococos mutans* presentes en placa dental de sujetos con aditamentos ortodónticos luego de estar en contacto con un enjuague bucal de origen vegetal en comparación con un enjuague bucal con clorhexidina.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir las características sociodemográficas de los participantes.
- Determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias en muestras de placa de los participantes.
- Relacionar la cantidad de unidades formadoras de colonias de *Streptococos mutans* con el tipo de enjuague utilizado.

4. MARCO TEORICO

La ortodoncia tiene como función de posicionar los dientes en la arcada dental, se ocupa del diagnóstico, estudio, prevención y corrección de las situaciones conocidas como maloclusiones, que consisten en irregularidades en la posición del diente y sus relaciones mandibulares, que pueden conducir a deformidades de la mandíbula y de la cara. Mediante la colocación de aparatos y accesorios especiales de los dientes, en combinación de fuerzas de tensión, presión y a veces con cirugía, el ortodontista puede conseguir una oclusión correcta de los dientes¹⁸.

La evolución sociocultural del mundo ha provocado el desarrollo de técnicas ortodónticas y con ello la introducción de aditamentos que proporcionan más facilidad en el manejo de la aparatología ortodóntica es por ello que hay que darle importancia a la higiene oral como estrategia preventiva para la reducción de enfermedades orales la cual hay que orientar primordialmente a la eliminación de la placa dentobacteriana que se caracteriza por micropelícula microbiana de células simples agregadas en micro colonias en una matriz polimérica extracelular¹⁹.

Este contenido microbiano presente en la placa se registra este tipo de depósitos y de su ubicación sobre las estructuras de soporte que permite clasificarla como placa

¹⁸ GUIMARÃES, GS; MORAIS, LS; SOUZA, MM; ELIAS, CN. Superficial morphology and mechanical properties of in vivo aged orthodontic ligatures. *En: Dental Press J Orthod.* 2013; vol.18, n^o.3, p.107-112.

¹⁹ HERAVI, F; MOAZZAMI, SM; KERAYECHAN, N; NIK E. A comparison of shear bond strength of immediate and delayed bonding of brackets to FRC bars using various orthodontic adhesives. *Aust Orthod J.* 2011; vol.27, n^o.1,4-9.

supragingival y subgingival, esta composición microbiana se caracteriza por la presencia de bacterias y a medida que la placa madura aumentan las formas de streptococos mitis, streptococos sobrinus, streptococos mutans es por ello que en la ortodoncia la utilización de ligaduras metálicas y ligaduras elásticas producen un cambio o aumento de la microflora oral al igual que podrían influir en la higiene oral del paciente de ahí que el ortodoncista debe conocer a fondo los beneficios y riesgos a los que somete a los pacientes colocándoles este tipo aditamentos^{20, 21}.

Entonces, es interesante conocer la micro flora que se desarrolla en ambos tipos de ligaduras ya que es posible asumir que durante su manejo por parte del operador podría aumentar el número de microorganismos que constituye la microflora oral normal, es por eso que un cambio en el ambiente oral ocasiona un desequilibrio que va acompañado de un aumento cuantitativo y cualitativo de la flora microbiana oral normal, este fenómeno ocasiona una migración de microorganismos que van a provocar daños locales y pueden envolver órganos vitales.

Los aditamentos utilizados durante el tratamiento ortodóntico favorecen a la formación de placa microbiana tanto la supragingival como la infragingival, por el

²⁰ MORROW, D; WOOD, DP; SPEECHLEY, M. Clinical effect of subgingival chlorhexidine irrigation on gingivitis in adolescent orthodontic patients. En: Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1992; vol.101, n^o.5, p.408-13.

²¹ BABAY, N; AL JASSER, N. Subgingival irrigation effects of chlorhexidine or sanguinarine on gingivitis in orthodontic patients. En: J Clin Pediatr Dent. 1996; vol.20, n^o.3, p.225-8.

aumento de acumulación de restos de comida que dificultan la higiene oral al no ser removidos adecuadamente ocasionan daños en el hospedero. Estos cambios se manifiestan clínicamente debido a los diferentes factores de patogenicidad de los agentes con inflamación, sangrado gingival y caries dental, microbios presentes en la placa y la posterior penetración y presencia de estos microorganismos en cavidad oral.

Entonces podemos definir la placa dental a una masa gelatinosa de bacterias que se adhiere a la superficie dental. La placa no está formada por residuos alimenticios adherentes, como se piensa habitual y erróneamente ni se debe a la acumulación casual de microorganismos oportunistas. En realidad la acumulación de la placa sobre los dientes constituye una sucesión de acontecimientos muy ordenados y perfectamente organizados. La supervivencia de los microorganismos en el entorno bucal depende de su capacidad para adherirse a la superficie, los microorganismos que flotan libremente son rápidamente evacuados de la boca por el flujo salivar y la deglución, sólo algunos microorganismos especializados, fundamentalmente *Streptococcus* son capaces de adherirse a superficies bucales²².

²² CARRANZA, F. Periodontología Clínica de Glickman. Séptima edición interamericana. México D. F. 1993; p.438-439.

El género *Streptococcus* es un grupo formado por diversos cocos grampositivos que normalmente se disponen en parejas o en cadenas. La mayoría de las especies son anaerobios facultativos y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono. Sus exigencias nutricionales son complejas y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar hidratos de carbono, proceso que produce ácido láctico, y son catalasa negativos, a diferencia de las especies del género *Staphylococcus*.

Existen muchos factores dentro del tratamiento ortodóntico que influyen en la formación de la placa bacteriana formada como son los tipos de brackets que se utilizan, los materiales de adhesión de la aparatología ortodóntica, aditamentos coadyuvantes en el tratamiento ortodóntico como son las cadenetas, ligaduras plásticas, ligaduras metálicas y elásticos²³.

4.1 CARIES DENTAL

La caries dental se define como un proceso o enfermedad dinámica crónica, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos y debido al desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante, dando como

²³ CORTIZO, M; FERNANDEZ, M. Bacterial Biofilms formed in vitro and in vivo on orthodontics appliances. Effect of antimicrobial agents. En: Revista Cénica Ciencias Biológicas, 2006; vol.37, n^o.3, p.48-53.

resultado una pérdida de mineral de la superficie dental, cuyo signo es la destrucción localizada de tejidos duros²⁴.

La caries dental se considera como una enfermedad en los tejidos dentales duros, cubriendo un continuo desde la primera pérdida de mineral a nivel iónico, pasando por las primeras manifestaciones clínicas y finalmente hasta la pérdida de estructura dental. Actualmente es ampliamente aceptado el hecho de que el inicio del proceso carioso sea inevitable a nivel de los cristales. Sin embargo, la progresión de una lesión microscópica a una lesión clínicamente detectable y la progresión en sí de lesiones tempranas clínicamente detectables aún no es una certeza, debido a que en sus estadios iniciales el proceso puede ser detenido y una lesión de caries puede volverse inactiva²⁵.

La enfermedad puede afectar el esmalte, la dentina y el cemento. Las destrucciones localizadas de los tejidos duros, las lesiones son así los síntomas de la enfermedad. Estos pueden clasificarse sobre una escala desde la pérdida inicial de mineral a nivel ultraestructural hasta la total destrucción del diente²⁶.

²⁴ TIMONEN, P; NISKANEN, M; SUOMINEN-TAIPALE, L; JULA, A; KNUUTTILA, M; YLÖSTALO, P. Metabolic syndrome, periodontal infection, and dental caries. En: J Dent Res. 2010; vol.89, n^o.10, p.1068-73.

²⁵ GUGNANI, N. Trial shows caries reductions at one year in school-based sealant programme. En: Evid Based Dent. 2013; vol.14, n^o3, p.71.

²⁶ MILLER, FY; CAMPUS, G; GIULIANA, G; PISCOPO, MR; PIZZO G. Topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. Curr Pharm Des. 2012; vol.18, n^o.34, p.5532-41.

4.2 PLACA DENTAL

La placa dental puede definirse como la diversa comunidad de los microorganismos encontrados en la superficie del diente como un biofilm, embebidos en una matriz extracelular de los polímeros de acogida y de origen microbiano²⁷.

En el microscopio electrónico la placa dental establecida se ve como una capa delgada celular y débilmente granular, entre las bacterias y la superficie del esmalte. Esta delgada e insignificante capa desempeña un papel importante y a veces, decisivo, en los sucesos que tiene lugar en la superficie del diente y que a veces acaban con la formación de una lesión de caries.

Esta capa delgada llamada película adquirida, forma la base para la adhesión de los microorganismos que posteriormente se desarrollaran en la placa dental.

Si una superficie de esmalte limpia es expuesta a la saliva, se recubrirá en cuestión de segundos por una delgada película orgánica. Los estudios, tanto in Vitro como in vivo, han demostrado que las proteínas de la saliva constituyen el elemento principal

²⁷ PASICH, E; WALCZEWSKA, M; PASICH, A; MARCINKIEWICZ, J. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. En: Postepy Hig Med Dosw. 2013; vol.67, n^o.1, p.736-41.

de esta película orgánica, y se cree que una absorción selectiva de proteínas salivales es el mecanismo por el cual se forma la película²⁸.

La unión de las primeras moléculas de la película adquirida a la superficie del esmalte es probablemente instantánea, y una superficie de esmalte limpia es presumiblemente cubierta, en cuestión de pocos segundos o menos. El tiempo requerido para que la película alcance el máximo grosor no se conoce y hay indicaciones de que la velocidad de formación puede variar de un individuo a otro, o quizá en un mismo individuo, de un momento a otro. Ha habido pocos intentos para medir la velocidad de formación, pero los resultados parecen mostrar que la película aumenta en grosor durante las primeras 1-2 horas y que el proceso se nivela a una velocidad mucho más lenta.

4.3 COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS

La colonización por microorganismos específicos comprende varias fases que involucran la deposición, adhesión, coagregación, crecimiento y reproducción de los microorganismos adheridos sobre la película adquirida. Luego de formada la película adquirida, ésta es colonizada por microorganismos que residen en la cavidad bucal. Las bacterias se adhieren a las glucoproteínas de la película adquirida depositada en la superficie del diente, de forma casi inmediata²⁹.

²⁸ THURNHEER, T. et al., Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. En: Appl Environ Microbiol, 2003; vol.69, n^o.3, p. 1702-9

²⁹ TAKAHASHI,N; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. En: Caries Res. 2008; vol.42, n^o.6, p.409-18.

Streptococcus sanguis, es el primer microorganismo que se adhiere a la superficie de la película adquirida y como tal, inicia la colonización microbiana en la formación de placa dental supragingival e inmediatamente se adhiere a *Actinomyces viscosus* . Algunos señalan que *S. sanguis* y *A. viscosus* son los microorganismos pioneros en la colonización de la placa dental, y que la asociación de estas bacterias con la superficie del diente es considerado como un prerequisite para la colonización posterior de especies de *Veillonella* y *Fusobacterium*²⁹. Otras bacterias que inician el proceso de colonización son *Streptococcus* del grupo oralis *S. oralis*, *S. mitis*, *Actinomyces* sp., *Neisserias* sp., y *Haemophilus* sp²⁹.

Después de siete días de formada la placa dental, las especies de *Streptococcus* continúan siendo el grupo predominante, pero a las dos semanas comienzan a predominar los bacilos anaerobios y las formas filamentosas. Estos cambios microbianos que se van produciendo van ligados a diversas causas, tales como: antagonismo por competencia de sustratos; producción de H₂O₂; y especialmente por el consumo de oxígeno en el ambiente, por lo que ocurre una sustitución de especies bacterianas Gram positivas facultativas por especies bacterianas anaerobias facultativas y estrictas Gram negativas, proceso llamado Sucesión Autogénica²⁹.

²⁹ TAKAHASHI,N; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. En: Caries Res. 2008; vol.42, n0.6, p.409-18

4.2 CLORHEXIDINA

La clorhexidina es un antiséptico tópico que se utiliza en todo el mundo desde 1954. Su uso en niños y adultos proporciona un excelente historial de seguridad y eficacia para aplicaciones tan diversas como el lavado de manos, la preparación preoperatoria de la piel, antisepsia vaginal, el tratamiento de la gingivitis y para prevenir la sepsis neonatal. Gluconato de clorhexidina es una biguanida catiónica hidrosoluble que se une a la pared celular bacteriana cargada negativamente, alterando el equilibrio osmótico de éstas³⁰.

A bajas concentraciones, la clorhexidina desequilibra la integridad de la membrana plasmática y en altas concentraciones, precipita el contenido citoplasmático, resultando en una lisis celular. Este antiséptico tiene una amplia actividad contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, anaerobios y aerobios facultativos, levaduras y algunos virus de envoltura lipídica, sin embargo no es esporicida³¹.

A nivel oral, se usa como colutorio a una concentración de 0.12% y en un minuto puede producir la disminución de más del 80% de los microorganismos aerobios y anaerobios colonizantes e infectantes en esta cavidad. Además su actividad microbicida posee un efecto residual al ser absorbido por las mucosas bucales,

³⁰ MILSTONE, AM; PASSARETTI, CL; PERL, TM. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. En: Clin Infect Dis. 2008; vol.46, n^o.2, p.274-81.

³¹ MCDONNELL, G; RUSSELL, AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. En: Clin Microbiol Rev. 1999; vol.12, n^o.1, p.147-79.

produciendo una liberación lenta y prolongada de hasta 5 horas después de su administración³².

Actualmente se considera el patrón de oro para la higiene bucal química ya que actúa sobre la formación de la placa dental y previene el desarrollo de enfermedades bucales³³.

4.4 ACEITES ESENCIALES

Existen diversas medidas preventivas para el control de la placa bacteriana pero con el avance de la terapia a base de extractos naturales y los estudios que día a día se realizan sobre estas, hacen que tome mayor fuerza y sean utilizadas como otra alternativa.

Los extractos de plantas se han usado desde hace siglos para el tratamiento de muchas patologías³⁴.

Si nos remontamos en la historia, el descubrimiento de un hombre congelado en los Alpes de más de 5300 años de antigüedad, perfectamente conservado y que tenía entre sus bienes varios frutos de *Piptopus betulinus*, de reconocida actividad anti fúngica y frente a especies del genero del *Mycobacterium* nos aporta una idea del

³² HOUSTON, S; HOUGLAND, P; ANDERSON, JJ; LAROCCO, M; KENNEDY, V; GENTRY, LO. Effectiveness of 0.12% chlorhexidine gluconate oral rinse in reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. En: Am J Crit Care 2002; vol.11, n^o.6, p.567-70.

³³ PEREIRA, SL; PRAXEDES, YC; BASTOS, TC; ALENCAR, PN; DA COSTA, FN. Clinical effect of a gel containing *Lippia sidoides* on plaque and gingivitis control. En: Eur J Dent. 2013; vol.7, n0.1, p.28-34.

³⁴ ARUMUGAM, P; GAYATRI, N; SUBATHRA, M; RAMESH, A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. En: Environmental Toxicology and Pharmacology. 2008; vol. 26, n0.3, p. 92-95.

conocimiento empírico por parte del poblador de aquella época sobre el beneficio que producía el consumo de algunas plantas³⁵.

Probablemente una de las primeras drogas del folklore tradicional que se transformo en una droga allá a finales del siglo XVIII, fue la digital (*Digitalis purpurea*) lo cual representa la farmacología moderna es oportuno mencionar que, entre las más antiguas actividades del ser humano está el estudio de plantas, en particular como fuentes de alimento. Siempre, el hombre se vio en la necesidad de hacer la distinción entre aquellas plantas que eran venenosas y las que no lo eran, adquiriendo así un amplio conocimiento sobre aquellas que poseían propiedades medicinales, que fue transmitiendo a través del tiempo al principio en forma verbal y luego por medio de la escritura. Sin duda alguna, en el reino vegetal existen muchas especies de plantas que contienen sustancias de gran importancia para la medicina y que aún están por descubrir. Muchas especies son estudiadas con frecuencia para hallar en ellas su posible valor farmacológico, en especial por sus propiedades estrogénicas, antipiréticas, antihelmínticas, astringentes, fungicidas, antibióticas³⁶.

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria, que mueve bastante dinero alrededor del mundo se conocen más de 1340 plantas aproximadamente como potenciales fuentes antimicrobianos pero se conocen más

³⁵ BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – A review. En: Food and Chemical Toxicology 2007; vol. 46, n^o.3, p. 446–475.

³⁶ NUÑEZ, L; AQUINO, MD. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). En: Braz J Microbiol. 2012; vol.43, n0.4, p.1255-60.

de 250000 especies de plantas que contiene una gran diversidad de componentes bioactivos.

Se debe destacar que los fármacos a base de plantas medicinales presenta una ventaja respecto a los tratamientos químicos, a menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que actuando por separado ofrece menor actividad que juntándolos. Se considera que la toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentra todos sus compuestos que cuando se encuentran purificado, este fenómeno llamado buffering.

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes entre los que se destacan: flavonoides, aceites esenciales terpenos y cumarina, los mecanismos exactos de acción de los extractos naturales aun no se conoce de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente deben su actividad bacteriostática y bactericida a la sobrecarga a la que someten a la membrana celular de los microorganismos, hecho que determina que pierda su control e integridad³⁷.

Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructura histológica especializada, a menudo localizada sobre o en la proximidad de las superficies de las plantas: células con aceites esenciales, pelos secretores, canales secretores y glándulas secretoras.

³⁷ ROTA, M; HERRERA, A; MARTÍNEZ, R; SOTOMAYOR, J; JORDÁN, M. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. En: Journal of food control. 2007; vol.19, n^o.2, p. 681-687.

Los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de las plantas:

-en las hojas (ajenjo, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, toronjil, etc.)

-en la raíz (angélica, azafrán, jengibre, valeriana, etc.)

-en las flores (manzanilla, clavo de olor, tomillo, árnica)

-en la semilla (cardamomo, anís, etc.)

-en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja)

Actualmente, las plantas medicinales están recuperando parte del protagonismo que tuvieron en los primeros tratamientos médicos, se percibe un nuevo auge de las aplicaciones terapéuticas de las plantas, una recuperación de su uso.

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Ensayo clínico controlado, donde se seleccionaron 50 participantes con aparatología ortodóntica fija, asistentes al postgrado de Ortodoncia de la Universidad de Cartagena, teniendo en cuenta la presencia de placa dental. Los participantes fueron asignados en forma aleatoria en tres grupos. En un grupo se aplicó el enjuague de clorhexidina (A), a otro el enjuague de Aceites esenciales (B) y al otro ningún tipo de enjuagues (Control). Los enjuagues fueron enmascarados en un envase genérico de plástico de color blanco de manera que el participante no tuviera la oportunidad de verificar el contenido y de esa forma que los participantes no supieran lo que estaban utilizando, además los participantes fueron asignados al grupo A o B mediante un procedimiento de números aleatorios.

5.2 MUESTRA

Se incluyeron en el estudio 50 participantes que asistieron al postgrado de Ortodoncia de la Universidad de Cartagena en los que se aplicó la técnica de ortodoncia fija durante el periodo comprendido entre enero de 2011 y enero del 2013.

5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Los participantes fueron seleccionados teniendo en cuenta el cumplimiento de los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

5.3.1. Criterios de inclusión. Personas tratados con ortodoncia fija en la facultad de odontología de la universidad de Cartagena, con mínimo un mes de tratamiento, durante el periodo comprendido entre enero de 2011 y enero de 2013, aceptar participar en el estudio a través de la firma de un consentimiento informado y que además tengan un índice de placa mayor de 15%.

5.3.2 Criterios de exclusión. Personas con enfermedad periodontal, que se estuvieran tomando algún tipo de enjuagatorio oral antibacteriano tipo clorexhidina por lo menos un mes antes de la toma de muestra, Pacientes con tratamiento ortodòntico inactivo y mujeres en estado de embarazo.

5.4 VARIABLES

Variable	Descripción	Naturaleza	Escala	Unidad de medición
Presencia de S. mutans	Detección de S. mutans en la placa p.	Cualitativa	Nominal	Presencia – ausencia
Cantidad de células de S. mutans	Número de células de S. mutans presente en la placa.	Cuantitativa	Discreta	Células en mg de placa
Edad	Grupo etario al cual pertenece el individuo	cuantitativa	Discreta	Años cumplidos
Sexo	Características corporales y fisiológicas de un individuo	cualitativa	Nominal	Masculino y femenino
Grupos	Determinado por el enjuague asignado.	Cualitativa	Nominal	Control Experimental

5.5 DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Con el objeto de determinar la efectividad antimicrobiana de los aceites esenciales (cascara de mandarina, albahaca, clavo de olor), in vivo en forma de enjuague se realizaron detalladamente los siguientes pasos:

Tomando como referencia el estudio in vitro EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, BACTERIA IMPLICADA EN LA PRODUCCION DE CARIES; cuyo objetivo fue obtener y evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales procedentes de las plantas *Elettaria cardamomum* L (Cardamomo), *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto), *Citrus reticulata* Blanco (Mandarina), *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Clavo de olor) y *Ocimum basilicum*L (Albahaca), contra *Streptococcus mutans* ATCC25175 y determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC) por medio del método de dilución en caldo. Estos aceites fueron mezclados entre sí para verificar si existía alguna clase interacción entre ellos que potenciara su actividad biológica. Estas mezclas fueron realizadas siguiendo el método estadístico del diseño factorial para llegar por medio de él a una posible mezcla ideal.

Observándose que los AE de *Citrus reticulata* Blanco (Mandarina), *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Clavo de olor) y *Ocimum basilicum*L (Albahaca) tienen un efecto marcado sobre el resultado final de la MIC. Por esta razón fueron seleccionados para conformar la mezcla ideal y luego medir su actividad.

Cuadro 1. Actividad Antimicrobiana expresada en MIC₅₀ (µg/ml) y MIC (µg/ml) de las mezclas de los Aceites Esenciales frente *Streptococcus mutans* (Límite inferior y superior)

MEZCLAS	Límite Inferior	MIC ₅₀ µg/ml	Límite Superior	MIC µg/ml
Clavo – Albahaca	127.08	196	294.06	>2475
Mandarina – Albahaca	149.77	183	224.40	1108
Cardamomo – Clavo	116.22	145	184.01	606
Cardamomo – Mandarina	1702.88	1987	-	>2150
Eucalipto – Albahaca	1000.56	1306	1667.36	2216
Eucalipto – Mandarina – Clavo – Albahaca	556.36	791	1089.90	1287
Eucalipto – Cardamomo	686.49	825	977.16	2337
Eucalipto – Cardamomo – Mandarina – Clavo	652.68	810	996.49	2312
Mandarina – Clavo – Albahaca (mezcla ideal)	336.90	425	539.04	1159

Posterior a esto en la facultad de química y farmacia en el laboratorio de de tecnología farmacéutica y cosmética de alimentos se preparó el enjuague ideal tomando de cada uno de los aceites a una concentración de 400ppm es decir 2 gramos, se adiciona texapon, sacarina sódica y agua, luego en el laboratorio de evaluación biológica de sustancias promisorias se realizó la prueba citotoxicologica que consiste en que la muestra suministrada, 0.5 g de cada aceite, se disuelve en 1.25 ml de etanol grado reactivo. Esta solución stock se diluyo en medio de cultivo para obtener las siguientes concentraciones: 4000, 3200, 2000, 1600, 1000, 800, 500, 400, 250, 200, 125, 100, 62.5, 50, 31.25, 25, 15.6, 12.5, 7.6 y 6.25µg/ml.

La línea celular de macrófagos RAW 264.7 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) fue mantenida rutinariamente en DMEM suplementado con Suero

Bovino Fetal, bicarbonato de sodio, penicilina y estreptomicina, a 37°C y 5% de CO₂. Las células en crecimiento exponencial, fueron desprendidas y resuspendidas. Para realizar el conteo de macrófagos presentes, se utilizó azul de trypan y cámara de Neubauer. Finalmente se ajustó la concentración para obtener una densidad de 2 x10⁶ células/mL.

La citotoxicidad de los compuestos fue evaluada empleando el método del MTT (Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Las células fueron tratadas con la mezcla de aceites esenciales a las concentraciones previamente detalladas e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tritón X-100 (20%) fue utilizado como control positivo. Seguidamente se adiciono una solución de MTT (0,25 mg/mL) y se incubo por 4 horas más. Transcurrido este periodo se solubilizaron los cristales de formazán con DMSO. El grado de reducción del MTT a formazán fue cuantificado midiendo la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Multiscan EX Thermo®). Se calculó el porcentaje de células viables comparado con células no tratadas y la concentración que inhibe la proliferación en un 50% (CL₅₀).

Los resultados se expresaron como la media ± E.S.M. de los datos obtenidos en dos experimentos independientes, se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀) empleando análisis de regresión no lineal, en el Software GraphPadPrism 5.0.

5.6 RECLUTAMIENTO DE MUESTRA Y ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Se citaron los participantes a la clínica de ortodoncia de la universidad de Cartagena para darle las respectivas recomendaciones, enseñanzas de higiene y respectivos controles de placa, hacerles entrega del enjuague ya envasado con estrictas medidas asépticas en los laboratorios de química y farmacia de la universidad de Cartagena y se le entregó un protocolo de cómo se iba a realizar el procedimiento o uso del mismo de la siguiente forma:

Se debía colocar una gota sobre los aditamentos ortodónticos una vez al día en el brackets más posterior, destilando la gota (20 microlitros) sobre el aditamento y dejando secar 30 segundos después de la aplicación y posteriormente se enjuaga con agua. Luego de 15 días se realizó la recolección de la muestra.

5.7 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE PLACA DENTAL

Se recolectó la placa, usando sondas periodontales calibradas de tal manera de recolectar siempre la misma cantidad de placa, en tubos Eppendorf, previamente esterilizados, que contenían un mililitro de solución salina. Sin embargo para determinar la cantidad de placa recolectada, los tubos se pesaron antes y después de la recolección y la diferencia fue expresada en miligramos (mg) de placa.

En cada una de las sesiones de toma de muestra, se tomó placa de un paciente de la clínica, no involucrado en el estudio y escogido al azar, como control positivo, estas muestras se rotularon y procesaron igual a las demás.

Se lleva al laboratorio de Microbiología y se somete al procedimiento de siembra; para ello los tubos marcados con cada uno de la identificación de los pacientes son sonicados con una amplitud del 5% a 40w, 5 pulsos en 0.9 segundos, para unificar la suspensión bacteriana.

Luego se realiza una dilución 1:10, tomando 100 µL y diluidos en 900µL, de esta suspensión se tomaron 0,2 µL para ser sembrados por agotamiento en las cajas de Petri marcadas con las mismas numeraciones de los pacientes que contenían como medio de cultivo agar TSY 20B.

Luego se incubaron por 24 horas a una temperatura de 37°C en condiciones de anaerobiosis y se procedió a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans*, colocando cada caja de Petri en el Esteromicroscopio (Leyca) por uno de los investigadores calibrados, usando las cuadrículas de los cuenta colonias y anotando en una réplica de estas el número de colonias presentes en cada uno de los espacios, para después sumar y establecer en número de colonias observadas, teniendo en cuenta los criterios de la FDA, brevemente; teniendo en cuenta que cada célula se divide en sus múltiples alrededores para producir colonias separadas en el agar, el número de colonias se refleja en el número de células UFC originalmente presentes. Es importante considerar un número limitado de colonias pues de no ser así, éstas pueden sobrepoblarse y dificultar el conteo de las mismas, se utilizó el rango de 25-250

colonias. Este método es deseable porque arroja el total de células viables (sólo células vivas); en contraste con el conteo microscópico y el conteo de peso seco.

5.8 ANALISIS ESTADISTICO

Para el almacenamiento, organización, procesamiento y reducción de los datos se construyó una matriz en Excel versión para Windows 2010, luego fueron analizados e interpretados transportando esta matriz al programa STATA versión para Windows 10.0. Se realizó prueba de normalidad a través del test de Shapiro-Wilk, se realizó análisis descriptivo a través de distribuciones de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y media y desviación estándar para variables cuantitativas. Para comparar la cantidad de unidades de formadoras de colonias con relación al tipo de enjuague bucal se utilizó el test de ANOVA con un nivel de significancia menor de 0.05.

5.9 ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo de la investigación fue sometido a la evaluación del comité de ética y la participación de los participantes estuvo regulada a través de un formato de consentimiento informado por escrito. Estos aspectos están basados en la resolución 8430 de 1993 Ministerio de Salud.

6. RESULTADOS

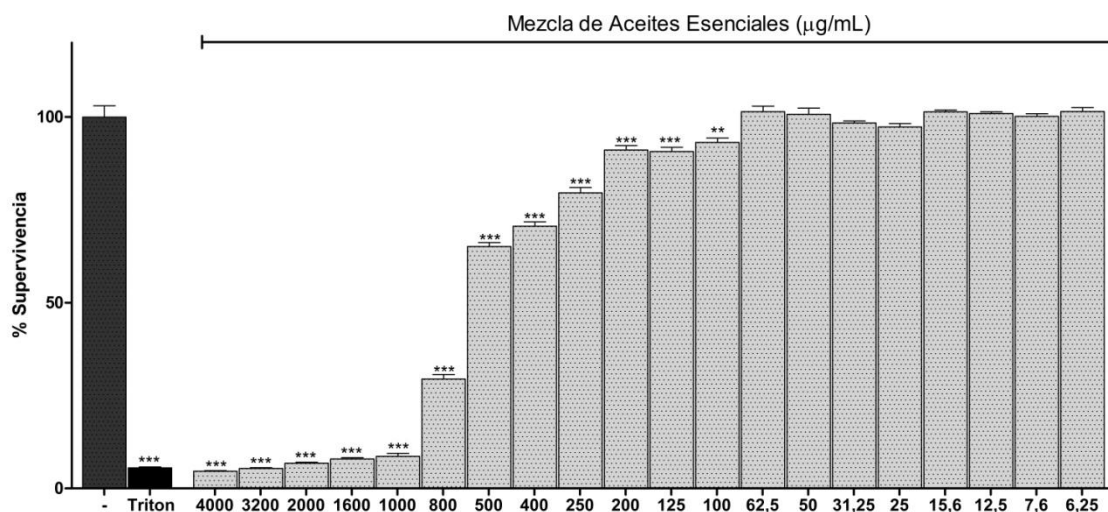
Durante el análisis realizado a las muestras de placa bacteriana de los participantes con ortodoncia se excluyeron 2 por contaminación en el proceso de laboratorio, arrojando la siguiente distribución: 23 perteneciente al grupo A (Clorhexidina) y 23 al grupo B (Aceites esenciales); y las muestras del grupo control. En cuanto al sexo en el grupo A el 78,3% eran femeninos y el grupo B el 78,3% masculino, teniendo en cuenta la edad se presentó un promedio de 22,1 años (DE=10) en el grupo A y de 23,3 años (DE=10,8) en el grupo B (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las características sociodemográficas por tipo de enjuague bucal.

	Clorhexidina	A. Esenciales
SEXO	Fr (%)	Fr (%)
Masculino	5 (21,7)	15 (78,3)
Femenino	18 (78,3)	8 (21,7)
EDAD (años)		
Media	22,1	23,3
Desviación estándar	10	10,8
Total	23	23

Los resultados obtenidos de la prueba citotoxicológica indican toxicidad de la mezcla de aceites esenciales a concentraciones mayores a 62,5 µg/mL para los macrófagos RAW 264,7 y CL₅₀ de 572.78 (522,88-626,49) µg/mL (Figura 1).

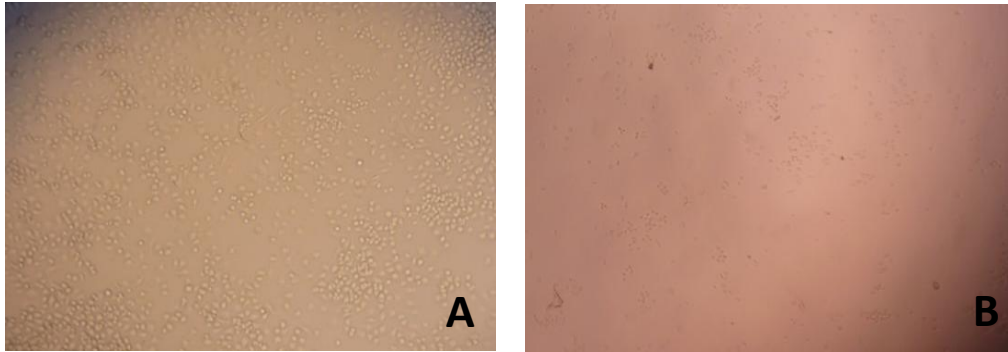
Figura 1. Efecto de la mezcla de aceites esenciales sobre macrófagos RAW 264,7.



Cada valor representa la media \pm ESM ($n=6$). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, comparados al grupo sin tratamiento.

Adicionalmente, con ayuda de un microscopio óptico, se evidenciaron cambios morfológicos en los macrófagos RAW 264,7 al ser sometidos a tratamiento con aceites esenciales a 4000 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Estos cambios incluyeron disminución del número de las células presentes, y pérdida de la forma celular característica del macrófago para adquirir morfología esférica (Figura 2).

Figura 2. Comparación de la morfología de células de la línea RAW 264,7



(A) Tratados con la mezcla de aceites esenciales en estudio a 4000 µg/ml, (B) Imágenes con aumento 10X.

En cuanto a las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* se presentó una media general de 6,90 (DE=0,66) UFC; para el grupo A la media fue de 6,81 (DE=0,72) UFC y para el grupo B de 6,96 (DE=0,59) UFC; en el grupo control fue de 7,45 (DE=0,13) UFC. Al comparar el grupo control con el grupo A y B no se encontró diferencias estadísticamente significativa con valores de $P=0.11$ y $P=0.13$ respectivamente.

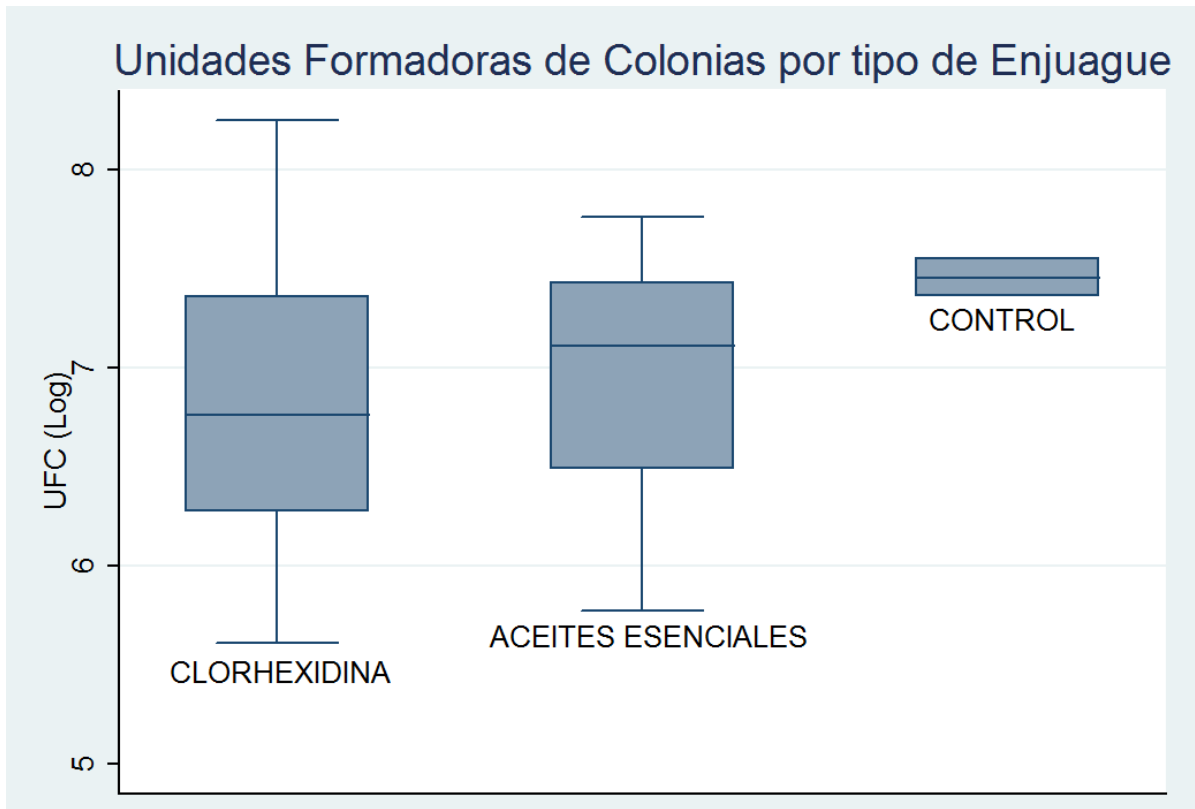
Al momento de relacionar la cantidad de unidades formadoras de colonias por con el tipo de enjuague bucal utilizado por los participantes con ortodoncia no se encontró diferencias estadísticamente significantes con un valor de $P=0.37$ (Tabla 2 y Figura 3).

Tabla 2. Cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* por tipo de enjuague bucal

	Clorhexidina	A. Esenciales
# de Muestra	UFC	UFC
1	6,27	6,53
2	5,79	6,30
3	6,45	6,16
4	5,61	6,10
5	5,73	6,49
6	6,11	7,32
7	5,88	7,68
8	6,63	7,43
9	7,56	7,72
10	6,76	7,60
11	6,80	7,48
12	6,66	7,33
13	7,36	7,23
14	8,25	6,85
15	7,55	7,16
16	7,20	7,10
17	7,16	6,10
18	7,79	6,94
19	7,85	5,77
20	6,97	6,83
21	7,13	7,12
22	6,43	7,23
23	6,71	7,76
Media*	6,81	6,96
Desviación estándar	0,72	0,59

*diff de medias, $p=0,37$. UFC (Log)= unidades formadoras de colonias, valores transformados en Log10.

Figura 3. Comparación de unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por tipo de enjuague



*diff de medias, $p=0,37$. UFC (Log)= unidades formadoras de colonias, valores transformados en Log10.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio tiene algunas limitantes como la falta de evaluación de otras variables como la dieta, la experiencia de caries y el pH, que pueden interferir con la dinámica de los depósitos microbianos, sin embargo, los procedimientos de asignación aleatoria y de cegamiento permiten reducir los posibles sesgos, además mediante los métodos utilizados se logró obtener la cantidad suficiente de placa no disturbada, que al llevarla a un medio selectivo mostró un crecimiento de *Streptococos Mutans*.

Los resultados sugieren que no existen diferencias estadísticamente significativa entre el uso de Clorhexidina y Aceites esenciales con relación a la cantidad de UFC de *Streptococos Mutans*, lo cual concuerda con lo reportado por Chatterjee³⁸ y Botelho³⁹ quienes afirman que no existen diferencias entre estas alternativas de tratamiento ya que los enjuagues de aceites esenciales son igualmente eficaz en comparación con Clorhexidina y se pueden utilizar como una terapia adjunta en el tratamiento de la gingivitis inducida por placa. En este mismo sentido no se encontraron diferencias entre estas alternativas y el grupo control, aunque el grupo que uso Clorhexidina mostró una menor cantidad de UFC al compararlo con el que

³⁸ CHATTERJEE, A; SALUJA, M; SINGH, N; KANDWAL, A. To evaluate the antigingivitis and antipalque effect of an Azadirachta indica (neem) mouthrinse on plaque induced gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. En: J Indian Soc Periodontol 2011; vol.15, n^o.4, p.398-401.

³⁹ BOTELHO, MC. Efficacy of a mouthrinse based on leaves of the neem tree (Azadirachta indica) in the treatment of patients with chronic gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. En: Journal of Medicinal Plants Research 2008; vol.2, n0.11, p.341-46.

uso Aceites esenciales, esto último concuerda con lo reportado por Da Silva⁴⁰ quien considera a la Clorhexidina como una medida segura y eficaz para la reducción de placa bacteriana, ya que logra una disminución de los niveles de *Streptococcus Mutans*, además sugiere que algunas especies bacterianas son resistentes a Aceites esenciales (*Cymbopogon*, *Plectranthusamboinicus* y *Conyzabonariensis*), del mismo modo Southern⁴¹ afirma que la Clorhexidina al compararla con enjuagues a base de plantas muestra mejores resultados, autores como Borges⁴², Filoche⁴³ y Chen⁴⁴ ratifican que la Clorhexidina sigue siendo el agente antimicrobiano más eficaz contra la placa dental previniendo de esta manera las enfermedades orales, especialmente aquellas relacionadas con la placa dental tales como la caries dental y gingivitis, lo que posiblemente se explica por su molécula bicationica que dificulta el ambiente de crecimiento Bacteriano⁴⁵.

⁴⁰ DA SILVA, NB; ALEXANDRIA, AK; DE LIMA. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. En: Contemp Clin Dent 2012; vol.3, n^o.3, p.302-5.

⁴¹ SOUTHERN, EN; MCCOMBS, GB; TOLLE, SL; MARINAK, K. The comparative effects of 0.12% chlorhexidine and herbal oral rinse on dental plaque-induced gingivitis. En: J Dent Hyg 2006; vol.80, n0.1, p.12-16.

⁴² BORGES, FM; DE MELO, MA; LIMA, JP; ZANIN, IC; RODRIGUES, LK. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: In vitro and in situ study. En: J Conserv Dent 2012; vol.15, n^o.1, p.22-6.

⁴³ FILOCHE, SK; SOMA, K; SISSONS, CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiol Immunol 2005; vol.20, n0.4, p.221-5.

⁴⁴ CHEN, F; WANG, D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. En: Expert Opin Ther Pat 2010; vol.20, n0.5, p.681-94.

⁴⁵ ADDY, M; MORAN, JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. En: Periodontol 2000; 15:52-4.

Contrario a esto autores como Nalina⁴⁶, Baykan⁴⁷ y Pratap⁴⁸ afirman que los productos naturales son prometedores agentes para prevenir las enfermedades orales ya que han evidenciado actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*. En este sentido, esta investigación evaluó una sustancia de aceites esenciales (albahaca, clavo de olor y mandarina) por ser la que presentó un mejor efecto marcado de la MIC₅₀ in vitro, resultado que es consistente con el reportado por Ahonkhai⁴⁹, quien encontró que estos aceites crean un efecto inhibitorio contra la flora microbiana oral, así mismo Runyoro⁵⁰ demostró que los aceites esenciales de las especies *Ocimum* podrían ser utilizados como potenciales agentes antimicrobianos, de igual forma Betoni⁵¹ en Brasil demostró que el clavo de olor tiene propiedad antimicrobiana.

En el presente estudio se destacó la concentración mínima inhibitoria de la albahaca y clavo de olor, considerándose como agentes antimicrobianos, lo que concuerda

⁴⁶ NALINA, T; RAHIM, Z. The Crude Aqueous Extract of Piper betle L. and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans*. En: American Journal of Biotechnology and Biochemistry 2007; vol.3, n0.1, p.10-15.

⁴⁷ BAYKAN, Ş; REZNICEK, G; ŞENOL, S; KARABAY, N; KONYALIOĞLU, S. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia L.* species from western Anatolia. En: Turk J Biol 2012; vol.36, n0.3, p.75-80.

⁴⁸ PRATAP, GM; MANOJ, KM; SAI, SA; SUJATHA, B; SREEDEVI E. Evaluation of three medicinal plants for anti-microbial activity. En: Ayu 2012; vol.33, n0.3, p.423-8.

⁴⁹ AHONKHAI, I; BA, A; EDOGUN, O; MU, U. Antimicrobial activities of the volatile oils of *Ocimum bacilicum L.* and *Ocimum gratissimum L.* (Lamiaceae) against some aerobic dental isolates. En: Pak J Pharm Sci 2009; vol.22, n0.4, p.405-9.

⁵⁰ RUNYORO,D; NGASSAPA, O; VAGIONAS, K, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. Food Chemistry 2010; vol.119, n^o.1, p.311-16.

⁵¹ BETONI, JE; MANTOVANI, RP; BARBOSA, LN; DI STASI, LC; FERNANDES, J. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; vol.101, n0.4, p.387-90.

con lo reportado Lee⁵² y Moon⁵³, este último evaluó la actividad antimicrobiana de Aceites esenciales de *Eugenia caryophyllata Thunberg* confirmando sus efectos sobre bacterias cariogénicas. Existen varios autores como Bayoub⁵⁴, Nzeako⁵⁵, Pinto⁵⁶ y Chee⁵⁷ quienes confirman la actividad antimicrobiana de los componentes de los Aceites esenciales como clavo de olor y Mandarina, incluso algunos han descrito la actividad antimicrobiana de los aceites volátiles de Mandarina contra bacterias gram-positivas y negativas. El efecto que tienen los Aceites esenciales sobre las bacterias o microorganismos posiblemente se deba a varios factores entre los cuales están su composición, la configuración estructural de los componentes constituyentes de los aceites vegetales volátiles, sus grupos funcionales y las posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes⁵⁸.

Aunque en el presente estudio las alternativas evaluadas no mostraron diferencias significativas con el grupo control, en es este último se mostró un cantidad mayor de

⁵² LEE, YS; JANG, KA; CHA, JD. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. En: J Biomed Biotechnol 2012; vol.20, n0.3, p.61-68.

⁵³ MOON, SE; KIM, HY; CHA, JD. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. En: Arch Oral Biol 2011; vol.56, n0.9, p.907-16.

⁵⁴ BAYOUB, K; BAIBAI, T; MOUNTASSIF, D; RETMANE, A; SOUKRI, A. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. En: African Journal of Biotechnology 2010; vol.9, n^o.27, p.4251-58.

⁵⁵ NZEAKO, BC; AL-KHAROUSI, ZS; AL-MAHROOQUI, Z. Antimicrobial activities of clove and thyme extracts. En: Sultan Qaboos Univ Med J 2006; vol.6, n0.1, p.33-9.

⁵⁶ PINTO, E; VALE-SILVA, L; CAVALEIRO, C; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. En: J Med Microbiol 2009; vol.58, n0.11, p.1454-62.

⁵⁷ CHEE, HY; LEE, MH. Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi. En: Mycobiology 2007; vol.35, n0.4, p.241-3.

⁵⁸ DORMAN, HJ; DEANS, SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; vol.88, n0.2, p.308-16.

UFC de *Streptococos* en placa dental, lo que puede sugerir que tanto los aceites esenciales con la clorhexidina ejercen un efecto sobre los microorganismos, del mismo modo la Clorhexidina sigue siendo un buen agente antimicrobiano para el control de placa, como lo sugiere Fard⁵⁹ quien afirma que los enjuagues bucales o colutorios más efectivos para la reducción de placa dental y reducción de la cantidad de *Streptococos mutans* en pacientes con ortodoncia son aquellos que contienen Clorhexidina.

⁵⁹ FARD, BK; GHASEMI, M; RASTGARIYAN, H; et al. Effectiveness of Mouth Washes on Streptococci in Plaque around Orthodontic Appliances. En: ISRN Dent 2011; vol.9, n^o.5, p.40-53.

8. CONCLUSION

Los aceites esenciales podrían ser considerados como una alternativa en el control de placa dental en personas con ortodoncia, teniendo en cuenta que presentan un comportamiento similar a la clorhexidina, en este sentido aunque esta mostró una menor cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* no existen diferencias significativas entre el uso de Clorhexidina y Aceites esenciales. Sin embargo, es necesario seguir evaluando estas dos alternativas de tratamiento bajo una mayor rigurosidad con un diseño de antes y después para evaluar una reducción de los microorganismos en la placa dental.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar otras investigaciones que tengan en cuenta otras variables que influyen en el comportamiento microbiológico a nivel de la cavidad bucal, tales como la dieta, experiencia de caries, adherencia a los enjuagues y tipos de aditamentos.

BIBLIOGRAFÍA

ADDY, M; MORAN, JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. En: *Periodontol* 2000; 15:52-4.

AHONKHAI, I; BA, A; EDOGUN, O; MU, U. Antimicrobial activities of the volatile oils of *Ocimum bacilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) against some aerobic dental isolates. En: *Pak J Pharm Sci* 2009; vol.22, n0.4, p.405-9.

ARNEBERG, O. Selection of streptococcus mutans and lactobacilli in an intra-oral human caries model. En: *J Dent Res* 1994; vol.63, n^o.10, p. 1197-1200.

ARUMUGAM, P; GAYATRI, N; SUBATHRA, M; RAMESH, A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008; vol. 26, n0.3, p. 92-95.

ATTIN, R; THON, C; SCHLAGENHAUF, U; WERNER, C; WIEGAND, A; HANNIG, C; ATTIN, T. Recolonization of mutans streptococci on teeth with orthodontic appliances after antimicrobial therapy. En: *Eur J Orthod*. 2005; vol.27, n^o.5, p.489-93.

BABAY, N; AL JASSER, N. Subgingival irrigation effects of chlorhexidine or sanguinarine on gingivitis in orthodontic patients. En: *J Clin Pediatr Dent*. 1996; vol.20, n^o.3, p.225-8.

BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – A review. En: *Food and Chemical Toxicology* 2007; vol. 46, n^o.3, p. 446–475.

BAYKAN, Ş; REZNICEK, G; ŞENOL, S; KARABAY, N; KONYALIOĞLU, S. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. En: *Turk J Biol* 2012; vol.36, n0.3, p.75-80.

BAYOUB, K; BAIBAI, T; MOUNTASSIF, D; RETMANE, A; SOUKRI, A. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. En: *African Journal of Biotechnology* 2010; vol.9, n0.27, p.4251-58.

BETONI, JE; MANTOVANI, RP; BARBOSA, LN; DI STASI, LC; FERNANDES, J. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; vol.101, n0.4, p.387-90.

BORGES, FM; DE MELO, MA; LIMA, JP; ZANIN, IC; RODRIGUES, LK. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: In vitro and in situ study. En: J Conserv Dent 2012; vol.15, n0.1, p.22-6.

BOTELHO, MC. Efficacy of a mouthrinse based on leaves of the neem tree (*Azadirachta indica*) in the treatment of patients with chronic gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. En: Journal of Medicinal Plants Research 2008; vol.2, n0.11, p.341-46.

CARRANZA, F. Periodontologia Clinica de Glickman. Septima edicion interamericana. Mexico D. F. 1993; p.438-439.

CASTAÑO, H; CIRO, G; ZAPATA, J; JIMÉNEZ S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. En: Vitae 2010, vol. 17, no. 2, p.149-154.

CHATTERJEE, A; SALUJA, M; SINGH, N; KANDWAL, A. To evaluate the antigingivitis and antipalque effect of an *Azadirachta indica* (neem) mouthrinse on plaque induced gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. En: J Indian Soc Periodontol 2011; vol.15, n^o.4, p.398-401.

CHEE, HY; LEE, MH. Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi. En: Mycobiology 2007; vol.35, n0.4, p.241-3.

CHEN, F; WANG, D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. En: Expert Opin Ther Pat 2010; vol.20, n0.5, p.681-94.

CORTIZO, M; FERNANDEZ, M. Bacterial Biofilms formed in vitro and in vivo on orthodontics appliances. Effect of antimicrobial agents. En: Rvista Cenicis Ciencias Biologicas, 2006; vol.37, n^o.3, p.48-53.

COSTA, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. En: Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; vol. 22, n^o.5, p.299-305.

COSTA, M; ABREU, MH; VASCONCELOS, M; LIMA, C; VERDI, M; FERREIRA, EF. Inequalities in the distribution of dental caries in Brazil: a bioethical approach. En: Cien Saude Colet. 2013, vol. 18, no. 2, p. 461-70.

DA SILVA, NB; ALEXANDRIA, AK; DE LIMA. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. En: Contemp Clin Dent 2012; vol.3, n0.3, p.302-5.

DORMAN, HJ; DEANS, SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; vol.88, n0.2, p.308-16.

FAN, M. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the Permanent First Molars of the Mosuo People in China. En:Original Paper 2003, vol. 10, n0.5, p. 374–80.

FARD, BK; GHASEMI, M; RASTGARIYAN, H; et al. Effectiveness of Mouth Washes on Streptococci in Plaque around Orthodontic Appliances. En: *ISRN Dent* 2011; vol.9, n^o.5, p.40-53.

FILOCHE, SK; SOMA, K; SISSONS, CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 2005; vol.20, n0.4, p.221-5.

FRAZÃO P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. En: *Braz Oral Res.* 2012, vol.26, no. 1, p.108-14.

GUGNANI, N. Trial shows caries reductions at one year in school-based sealant programme. En: *Evid Based Dent.* 2013; vol.14, n^o3, p.71.

GUIMARÃES, GS; MORAIS, LS; SOUZA, MM; ELIAS, CN. Superficial morphology and mechanical properties of in vivo aged orthodontic ligatures. En: *Dental Press J Orthod.* 2013; vol.18, n^o.3, p.107-112.

HATA S, HATA H, MIYASAWA-HORI H, KUDO A, MAYANAGI H. Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. En: *Journal compilation The Society for Applied Microbiology.* 2006; vol. 42, n^o.3, p. 127–131.

HERAVI, F; MOAZZAMI, SM; KERAYECHAN, N; NIK E. A comparison of shear bond strength of immediate and delayed bonding of brackets to FRC bars using various orthodontic adhesives. *Aust Orthod J.* 2011; vol.27, n^o.1,4-9.

HOUSTON, S; HOUGLAND, P; ANDERSON, JJ; LAROCCO, M; KENNEDY, V; GENTRY, LO. Effectiveness of 0.12% chlorhexidine gluconate oral rinse in reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. En: *Am J Crit Care*2002; vol.11, n^o.6, p.567-70.

LEE, YS; JANG, KA; CHA, JD. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. En: *J Biomed Biotechnol* 2012; vol.20, n0.3, p.61-68.

MANNAA, A; CARLÉN, A; CAMPUS, G; LINGSTRÖM, P. Supragingival plaque microbial analysis in reflection to caries experience. En: BMC Oral Health. 2013, vol. 13, n0.5, p. 5-10.

MCDONNELL, G; RUSSELL, AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. En: Clin Microbiol Rev. 1999; vol.12, n0.1, p.147-79.

MILSTONE, AM; PASSARETTI, CL; PERL, TM. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. En: Clin Infect Dis. 2008; vol.46, n0.2, p.274-81.

MOON, SE; KIM, HY; CHA, JD. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. En: Arch Oral Biol 2011; vol.56, n0.9, p.907-16.

MORROW, D; WOOD, DP; SPEECHLEY, M. Clinical effect of subgingival chlorhexidine irrigation on gingivitis in adolescent orthodontic patients. En: Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1992; vol.101, n^o.5, p.408-13.

MOTA, SM; ENOKI, C; ITO, IY; ELIAS, AM; MATSUMOTO, MA. Streptococcus mutans counts in plaque adjacent to orthodontic brackets bonded with resin-modified glass ionomer cement or resin-based composite. En: Braz Oral Res. 2008; vol.22, n^o.1, p.55-60.

NALINA, T; RAHIM, Z. The Crude Aqueous Extract of Piper betle L. and its Antibacterial Effect Towards Streptococcus mutans. En: American Journal of Biotechnology and Biochemistry 2007; vol.3, n0.1, p.10-15.

NAYAK, SS; ANKOLA, AV; METGUD, SC; BOLMAL, U. Effectiveness of mouthrinse formulated from ethanol extract of Terminalia chebula fruit on salivary Streptococcus mutans among 12 to 15 year old school children of Belgaum city: a randomized field trial. En: J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2012, vol. 30, no. 3, p. 231-6.

NUÑEZ, L; AQUINO, MD. Microbicide activity of clove essential oil (Eugenia caryophyllata). En: Braz J Microbiol. 2012; vol.43, n0.4, p.1255-60.

NZEAKO, BC; AL-KHAROUSI, ZS; AL-MAHROOQUI, Z. Antimicrobial activities of clove and thyme extracts. En: Sultan Qaboos Univ Med J 2006; vol.6, n0.1, p.33-9.

PANDIS, N; PAPAIOANNOU, W; KONTOU, E; NAKOU, M; MAKOU, M; ELIADES, T. Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. En: Eur J Orthod. 2010; vol. 32, n^o.1, p.94-9.

PAOLANTONIO, M., et al., Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. En: J Clin Periodontol, 1996; vol. 23, n0.2, p. 112-8.

PAPAS, AS; VOLLMER, WM; GULLION, CM; BADER, J; LAWS, R; FELLOWS, J. Efficacy of chlorhexidine varnish for the prevention of adult caries: a randomized trial. En: J Dent Res. 2012, vol. 91, no. 2, p.150-5.

PASICH, E; WALCZEWSKA, M; PASICH, A; MARCINKIEWICZ, J. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. En: Postepy Hig Med Dosw. 2013, vol. 67, no. 14, p.736-41.

PEREIRA, SL; PRAXEDES, YC; BASTOS, TC; ALENCAR, PN; DA COSTA, FN. Clinical effect of a gel containing Lippia sidoides on plaque and gingivitis control. En: Eur J Dent. 2013; vol.7, n0.1, p.28-34.

PINTO, E; VALE-SILVA, L; CAVALEIRO, C; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. En: J Med Microbiol 2009; vol.58, n0.11, p.1454-62.

PRATAP, GM; MANOJ, KM; SAI, SA; SUJATHA, B; SREEDEVI E. Evaluation of three medicinal plants for anti-microbial activity. En: Ayu 2012; vol.33, n0.3, p.423-8.

ROTA, M; HERRERA, A; MARTÍNEZ, R; SOTOMAYOR, J; JORDÁN, M. Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. En: Journal of food control. 2007; vol.19, n^o.2, p. 681-687.

RUNYORO,D; NGASSAPA, O; VAGIONAS, K, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four Ocimum species growing in Tanzania. Food Chemistry 2010; vol.119, n0.1, p.311-16.

SHIVAKUMAR, K; PRASAD, S; CHANDU, G. International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries. En: J Conserv Dent. 2009, vol. 12, no. 1, p.10-6.

SOUTHERN, EN; MCCOMBS, GB; TOLLE, SL; MARINAK, K. The comparative effects of 0.12% chlorhexidine and herbal oral rinse on dental plaque-induced gingivitis. En: J Dent Hyg 2006; vol.80, n0.1, p.12-16.

SUKONTAPATIPARK, W., et al., Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. En: Eur J Orthod. 2001; vol.23, n^o.5, p. 475-84.

TAKAHASHI, N; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. En: Caries Res 2008, vol. 42, n0.6, p. 409–418.

THURNHEER, T. et al., Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. En: Appl Environ Microbiol, 2003; vol.69, n^o.3, p. 1702-9

TIMONEN, P; NISKANEN, M; SUOMINEN-TAIPALE, L; JULA, A; KNUUTTILA, M; YLÖSTALO, P. Metabolic syndrome, periodontal infection, and dental caries. En: J Dent Res. 2010; vol.89, n^o.10, p.1068-73.

USHA, C. Dental caries - A complete changeover (Part I). En: J Conserv Dent. 2009, vol.12, no.2, p. 46-54.

WANG, ZY; WANG, JQ; ZHOU, Y; ZHAO, D; XIAO, B. Quantitative detection of Streptococcus mutans and bacteria of dental caries and no caries groups in permanent teeth from a north China population. En: Chin Med J (Engl). 2012, vol. 125, no. 21, p. 3880-4.

Anexo 1. Consentimiento informado

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DILIGENCIAMIENTO DE ENCUESTA

Titulo. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE ESTREPTOCOCOS MUTANS PRESENTES EN PLACA DENTAL DE SUJETOS CON ADITAMENTOS ORTODÓNTICOS LUEGO DE ESTAR EN CONTACTO CON UN ENJUAGUE BUCAL DE ORIGEN VEGETAL

INVESTIGADORES: LUIS EDUARDO CARMONA ARANGO, CARLOS ENRIQUE GUILLEN GUERRERO y LUIS CARLOS MARZAN GENEY

Según la resolución del Ministerio de Salud de Colombia No. 008430 de 1993 y Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de 2000.

El objetivo del estudio es: Evaluar la efectividad de un enjuague bucal de origen vegetal sobre el Estreptococos mutans encontrado en aditamentos ortodonticos en pacientes de la Universidad de Cartagena..

Yo _____ identificado con cédula de ciudadanía No _____ declaro que autorizo y me comprometo a proporcionar la información necesaria para participar en el presente estudio. Se me ha informado que estos procedimientos no presentan ningún proceso que requiera riesgo para mi salud y me han confirmado los investigadores que los resultados del presente estudio van a ser presentados compilados, sin vulnerar su intimidad y el derecho de preservar su identidad y la condición que presenta. Además declaro que en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna y en completo conocimiento de la naturaleza, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla por parte de los investigadores de todos los aspectos relacionados con la propuesta de investigación.
2. Haber sido informado de que mi participación en el proyecto consiste en utilizar un enjuague bucal y donar una muestra de placa dental para análisis microbiológico. .
3. Que el equipo de investigadores me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
4. Que estoy de acuerdo en el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos en el presente estudio.
5. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud y no me generará ningún costo adicional.
6. Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores antes mencionado
7. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.
8. Que el grupo responsable de la investigación ofrecerá tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho, en el caso de daños que me afecten directamente, causados por la investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores mencionados, a realizar el referido estudio en las muestras de placa dental e que acepto donar a los fines previamente indicados.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Cualquier duda podré comunicarme directamente con los investigadores al teléfono 6698184 ext 110 de la ciudad de Cartagena.

Firma del Voluntario

Firma del Investigador Principal CC 79533296

Huella

Firma Testigo 1

Firma de testigo 2

Lugar y Fecha: _____

Anexo 2. Formato de recolección de datos

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE ESTREPTOCOCOS MUTANS
PRESENTES EN PLACA DENTAL DE SUJETOS CON ADITAMENTOS ORTODÓNTICOS
LUEGO DE ESTAR EN CONTACTO CON UN ENJUAGUE BUCAL DE ORIGEN VEGETAL**

NUMERO DE MUESTRA_____

FECHA:_____

DATOS DE IDENTIFICACION

NOMBRE:-_____

CEDULA:_____

SEXO:_____

VARIABLES

1. PRESENCIA DE STREPTOCOCOS MUTANS

A. SI B. NO

2. CANTIDAD DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS_____

EXAMINADOR_____

Anexo 3. Tabla matriz

N°	EDAD	SEXO	ENJUAGUE	UFC (Log)	N°	EDAD	SEXO	ENJUAGUE	UFC (Log)
1	34	1	0	6.27	41	23	1	0	7.13
2	48	1	0	5.79	42	23	1	0	6.43
4	49	1	0	6.45	43	24	1	0	6.71
6	24	1	0	5.61	3	14	1	1	6.53
7	16	0	0	5.73	5	14	0	1	6.30
8	18	0	0	6.11	9	55	1	1	6.16
10	14	0	0	5.88	13	30	0	1	6.10
11	21	1	0	6.63	14	17	1	1	6.49
12	17	0	0	7.56	15	18	0	1	7.32
17	15	1	0	6.76	16	14	0	1	7.68
19	16	1	0	6.80	18	19	0	1	7.43
20	18	0	0	6.66	21	14	0	1	7.72
22	16	1	0	7.36	25	25	0	1	7.60
23	13	1	0	8.25	26	34	1	1	7.48
24	32	1	0	7.55	28	19	0	1	7.33
27	20	1	0	7.20	29	44	1	1	7.23
30	16	1	0	7.16	31	17	1	1	6.85
33	23	1	0	7.79	32	25	0	1	7.16
35	13	1	0	7.85	34	20	0	1	7.10
38	15	1	0	6.97	36	40	0	1	6.10
44	14	0	1	7.12	37	27	1	1	6.94
45	17	0	1	7.76	39	23	0	1	5.77
46	21	0	2	7.55	40	18	1	1	6.83
47	18	1	2	7.36					

Sexo: 0=Masculino, 1= Femenino, **Enjuague:** 0= Chorhexidina, 1=A. esenciales