

**EFFECTIVIDAD DE UN ENJUAGUE BUCAL A BASE DE ACEITES
ESENCIALES (*Eugenia Caryophyllata Thunberg* “CLAVO DE OLOR” *Citrus
Tangerina* “MANDARINA” Y *Ocimum Basilicum* “ALBAHACA”) SOBRE
PLACA DENTAL Y *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN NIÑOS DE 8 A 10 AÑOS**

**ADRIAN ISAAC CORREA TURIZO
LICETH MARIA JIMENEZ PEREZ**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSTGRADO DE ODONTOPEDIATRIA Y ORTOPEDIA MAXILAR
CARTAGENA D.T. y C.**

2013

**EFFECTIVIDAD DE UN ENJUAGUE BUCAL A BASE DE ACEITES
ESENCIALES (*Eugenia Caryophyllata Thunberg* “CLAVO DE OLOR” *Citrus
Tangerina* “MANDARINA” Y *Ocimum Basilicum* “ALBAHACA”) SOBRE
PLACA DENTAL Y *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN NIÑOS DE 8 A 10 AÑOS**

**ADRIAN ISAAC CORREA TURIZO
LICETH MARIA JIMENEZ PEREZ**

**Trabajo de Grado Para Optar el Titulo de
Odontopediatría y Ortopedia Maxilar**

LUIS CARMONA, ODONTÓLOGO.M.Sc.

Director

GERMAN MATIZ MELO Q.F. PhD.

Codirector

FARIT DAMIAN GONZALEZ

Asesor metodológico

**Trabajo realizado con el apoyo de los laboratorios del Grupo de
Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos y el
laboratorio de evaluación biológica de sustancias promisorias y de la
Universidad de Cartagena**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSTGRADO DE ODONTOPEDIATRIA Y ORTOPEDIA MAXILAR
CARTAGENA DE INDIAS D. T. Y C.,**

2013

NOTA DE APROBACIÓN DEL JURADO

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

En primer lugar darle gracias al TODOPODEROSO por darme siempre sabiduría en todo este proceso académico y de la vida, agradecer a mi director el profesor Dr. Luis Eduardo Carmona Arango la confianza depositada en mi persona, por su continuo estímulo en la consecución de este proyecto, por su ejemplo de constancia y capacidad de trabajo.

Al Dr. Farith González, su ayuda, rigor investigador y profesionalidad demostrada en este estudio. A los laboratorios en tecnología farmacéutica y cosmética de alimentos liderado por el Dr. German Matiz, el de evaluación biológica de sustancias promisorias liderado por el Dr. Luis Franco y el de microbiología su gran apoyo para realizar este proyecto.

A mis padres aunque uno de ellos está en el cielo yo sé que siempre estuvo conmigo en los momentos difíciles y buenos, hermanos y amigos por su apoyo incondicional.

Mi esposa e hija que a pesar que las abandonaba todos los fines de semana me comprendían y me daban su bendición y estímulo para seguir adelante.

A los compañeros y profesores del posgrado de odontopediatria y ortopedia maxilar por la ayuda y comprensión brindada en este proceso.

A todos aquellos que de una u otra forma me dieron su colaboración y ayuda, sin cuyo inestimable apoyo habría resultado demasiado difícil abarcar esta investigación

Adrián Correa Turizo

Artículo 23 de la resolución número 13 de julio de 1946

“La Universidad ni el jurado examinador, se hacen responsables de los conceptos emitidos en el presente trabajo, solo velara que no se publiquen nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia “

CONTENIDO

	Pág.
GLOSARIO	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. OBJETIVO	24
3.1 OBJETIVO GENERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
4. MARCO TEORICO	25
4.1 CARIES DENTAL	25
4.2 PLACA DENTAL	26
4.3 COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS	29
4.4 ACEITES ESENCIALES	33
4.5 MÉTODOS EN AGAR.....	40
4.5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana	41
5. METODOLOGIA	43
5.1 TIPO DE ESTUDIO.....	43
5.2 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	43
5.3 PLAN DE ANÁLISIS	47
5.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1 DISTRIBUCIÓN DE VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS.....	49
6.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS ENJUAGUES APLICADOS A LOS PARTICIPANTES.	49
6.3 EFECTO DE LA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264,7.....	50
6.4 VARIABILIDAD EN LA CANTIDAD DE PLACA DENTAL OBTENIDA DE LOS DOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	51

6.5 RESULTADO UFC STREPTOCOCOS MUTANS.....	52
6.6 COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LAS UFC PARA LOS TRATAMIENTOS BUCALES	53
6.7 COMPARACIÓN DE RANGOS MÚLTIPLES DE LOS VALORES MEDIOS DE LAS UFC, ENCONTRADOS EN CADA TRATAMIENTO EXPERIMENTAL.....	54
7. DISCUSIÓN.....	56
8. CONCLUSIÓN.....	61
9. RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS.....	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características socio-demográficas de los participantes	49
Tabla 2. Distribución de los enjuagues aplicados a los participantes	50
Tabla 3. Variabilidad en la cantidad de placa dental obtenida de los dos grupos de estudio	52
Tabla 4. Resultado UFC Streptococosmutans	53
Tabla 5. Comparativo de los valores de las UFC para los tratamientos bucales tabla ANOVA para sqrt (UFC) por tratamiento.....	53
Tabla 6. Comparación de rangos múltiples de los valores medios de las UFC, encontrados en cada tratamiento experimental. Metodo : 95,0 porcentaje Tukey HS.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto de la mezcla de aceites esenciales sobre macrófagos RAW 264,7,.....	50
Figura 2. Comparación de la morfología de células de la línea RAW 264,7 (A), al ser tratados con la mezcla de aceites esenciales en estudio a 4000 µg/ml (B), Imágenes con aumento 10X,	51
Figura 3. Gráfico de cajas y bigotes en el que comparan los valores medios de las UFC de cada tratamiento bucal.	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO MENORES DE EDAD.....	74
Anexo 2. FOTOGRAFIAS	76
Anexo 3. COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DEL ANOVA	78

GLOSARIO

M.I.C : concentración mínima inhibitoria

U.F.C : unidad formadora de colonia

H₂O₂ : Peróxido de Hidrogeno

TSY20B : Trypticasa soya - extracto de levadura, Sacarosa, Bacitracina

RAW : Células de macrófago de ratón

ATCC : American Type Culture Collection

mL : Mililitro

µg : Microgramo

nm : nanómetro

DMEM : suplementado con suero bovino fetal, bicarbonato de sodio, penicilina y estreptomina

MTT : (Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

DMSO: Dimetilsulfoxido

AE : Aceites Esenciales

CHX : Clorhexidina

E.E.P.P: Extracto Etanolico de Propoleo Peruano

RESUMEN

PROBLEMA. El *Streptococcus mutans* es el microorganismo más relacionado con la caries dental, En la actualidad existen numerosas alternativas para contribuir a la reducción de microorganismos presentes en la placa dental una de estas es el uso de enjuagues bucales como la clorhexidina. Diversos autores han estudiado la posibilidad de utilizar métodos naturales con extractos de aceites esenciales los cuales han tenido efectos favorables sobre la reducción de microorganismos presentes en cavidad oral.

OBJETIVO. Evaluar clínicamente la efectividad de un enjuague bucal a base de aceites esenciales *Eugenia caryophyllata thunberg* “clavo de olor” *Citrus tangerina* “mandarina” *Ocimum basilicum* “albahaca” sobre placa dental y específicamente microorganismos cariogénicos como el *Streptococcus mutans*.

METODOLOGÍA. se toman 32 sujetos de los cuales a 16 se les aplicó enjuague a base de aceites esenciales y a 16 enjuague clorhexidina, colocado en una placa de acrílico palatal con una porción de esmalte sano por 8 días, posteriormente se realizó la recolección de la placa bacteriana de estas porciones de esmalte y también placa bacteriana de los dientes como grupo control negativo; pesamos, luego realizó zonicación con una amplitud del 5% a 40w, 5 pulsos en 0,9 segundos, para unificar la suspensión bacteriana, posteriormente se realizó la siembra en medio TSY 20B, incubamos y finalmente procedimos a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* en el esteromicroscopio.(Leica Mz 95)

RESULTADOS. como resultado de la comparación de los valores de las UFC(unidades formadoras de colonia), mediante el análisis de varianza a una vía para los dos tratamientos bucales y su respectivo control, encontrándose que

estos presentaban diferencias estadísticamente significativas con p-valor menor a 0,05 En donde la mayor cantidad de colonias para el grupo de enjuague de aceites esenciales fue de 650.000 UFC ug/mL, en el grupo de enjuague con clorhexidina (control positivo) la mayor cantidad de colonias fue de 580.000 UFC ug/ml, así mismo la mayor cantidad de colonia para el grupo control (negativo) fue de 2'730.000 UFC ug/mL.

CONCLUSION. Los aceites esenciales son alternativas en la reducción de la colonización de *Streptococcus mutans* en la placa dental, al presentar un comportamiento casi similar a la clorhexidina.

PALABRAS CLAVE: Aceites esenciales, clorhexidina, caries dental, *Streptococcus mutans* , carga bacteriana, placa dental, (DECS)

INTRODUCCIÓN

En Colombia, según el Programa Nacional de Salud Bucal del Ministerio de Salud la caries dental es considerada uno de los principales problemas de salud pública, debido a su alta prevalencia y severidad ya que es muy difícil lograr que el paciente se cepille continuamente, use el hilo dental, enjuague bucal y que, en general, tenga buenos hábitos de higiene bucal, herramientas que minimizan tanto la caries como la enfermedad periodontal.

Para comenzar la caries es una de las enfermedades más frecuentes que encontramos en cavidad oral. Resulta de un desequilibrio entre la superficie dental y el fluido de placa bacteriana circundante y afecta la mayor parte de la población principalmente la infantil¹.

Dentro de la etiología de la caries dental, encontramos relacionados diversos microorganismos destacándose el *Streptococcus mutans*, como el causante número uno de la enfermedad debido a sus características de aciduricidad y acidogenicidad.

Bacterias acidogénicas tales como *Streptococcus mutans* y especies de *Lactobacillus ssp* producen productos metabólicos, tales como ácido láctico y ácido acético con valores de pKa (función p de la constante de acidez) de 3,86% y 4,75%. Tales ácidos pueden reducir el pH de la placa por debajo de 5,5, lo que conduce a la iniciación y el desarrollo de caries.

¹ EKSTRAND KR, RICKETS DNJ, Kidd EAM. OcclusalCaries.En: Pathology, Diagnosis and Logical Management. DentUpdate. 2001, vol.28, p. 380 – 7

La formación de la caries dental es causada por la colonización y la acumulación de microorganismos orales siendo la adhesión el primer paso en el proceso de colonización.

En esta patología, las bacterias *streptococcus* del grupo *mutans* están asociadas con mayor frecuencia al desarrollo de lesiones cariosas, por lo que, se observa cómo estos microorganismos desempeñan un papel preponderante en la patogenia de la caries, debido a su capacidad para favorecer la desmineralización del diente.

Ahora bien con el objeto de evitar la acción de estas bacterias se han utilizado diferentes estrategias y procedimientos a partir de una fuente de materia prima más económica y natural. Es así, como se ha investigado y demostrado la acción antimicrobiana de diversos productos naturales sobre las bacterias productoras de caries como el cardamomo, clavo de olor, etc.

La actividad antimicrobiana *in vitro*, tiene una amplia dedicación en las investigaciones, mas no así los estudios *in vivo* donde se usen los aceites esenciales como enjuagues en la prevención de enfermedades orales.

En concordancia con tales consideraciones, el objeto de la investigación, fue evaluar clínicamente la eficacia antimicrobiana *in vivo* de la mezcla de aceites esenciales a base de esencias de: clavo de olor, albahaca, mandarina en forma de enjuague sobre *Streptococcus mutans*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las enfermedades más frecuentes en cavidad oral, se encuentra la caries y la gingivitis, las cuales son causantes de las enfermedades más prevalentes en cavidad oral. Estas enfermedades se encuentran relacionadas con diversos microorganismos siendo el *Streptococcus mutans*, el microorganismo más relacionado con la caries dental. Teniendo en cuenta, estos microorganismos como el principal factor etiológico de dicha enfermedad, nos conduce a diseñar diversas medidas de prevención que nos ayuden a la eliminación o disminución de éste a nivel de cavidad oral, Por consiguiente es de mucha importancia crear varias estrategias que garanticen un control microbiológico y colaboren con el cepillado dental; es allí donde el uso de antimicrobianos y antisépticos, de uso tópico o local principalmente son alternativas importantes.

La caries dental es un proceso dinámico que ocurre en los depósitos microbianos sobre la superficie dental, resulta del desequilibrio entre la superficie dental y el fluido de placa circundante de tal forma que, en el tiempo, el resultado neto puede ser una pérdida de mineral de la superficie dental².

El último estudio de salud bucal reveló que el 60,4% de los niños de 5 años tienen historia de caries dental y que cada niño tiene en promedio tres dientes afectados, a los 7 años el 73,8% han experimentado caries en los dientes primarios y el 19,9 % en los permanentes³.

² MINISTERIO DE SALUD COLOMBIA .Estudio Nacional de Salud Bucal. Serie Documentos Técnicos. tomo VII. Bogota.1999.

³ *Ibíd.*, p. 3

Los autores González y col en el año (2005), realizaron un estudio en la población escolarizada entre 5 y 14 años de la Boquilla, Cartagena, se observó un alto porcentaje en la prevalencia de caries del 99% y un índice de placa bacteria de 79 %⁴.

Teniendo en cuenta esta prevalencia se tiene como estrategia para evitar estos problemas de salud pública, diversos métodos dentro de los cuales están, los enjuagues bucales a base de aceites esenciales, los cuales son soluciones que se emplean después del cepillado con el fin de eliminar gérmenes y bacterias que ayudan a la formación de la placa bacteriana⁵.

Los *Streptococcus mutans* son cocos Gram-positivos, inmóviles, anaerobio facultativo que puede metabolizar los hidratos de carbono y se consideran el principal agente etiológico de la caries dental⁶. La cariogenicidad de esta bacteria está asociado a varios factores como el dextrano, la producción de alta concentración de ácido en la placa y la actividad glucosiltransferasas.

Los glucanos insolubles en agua son importantes constituyentes del biofilm de placa dental ya que facilitan la acumulación de *Streptococcus mutans* y otras bacterias orales, La formación de biopelícula se ve influida por la cantidad de glucosiltransferasas producidas por *Streptococcus mutans*.

Los *Streptococcus mutans* son los patógenos más frecuentes aislados de la placa dental humana y su prevalencia se ha reportado en varios estudios

⁴GONZÁLEZ F, ALFARO L, NIETO C, CARMONA L. Evaluación de las condiciones de salud oral y los conocimientos en niños escolarizados entre 5 y 14 años de la población de Boquilla Cartagena de indias 2005. En: revista científica Un Bosque odontología. 2006, vol.12, Nº 1, p. 25-34.

⁵ SOUTHERN E, MCCOMBS G, TOLLE S Lynn, MARINAK Ken. The Comparative Effects of 0.12% Chlorhexidine and Herbal Oral Rinse on Dental Plaque-Induced Gingivitis. En: Journal of Dental Hygiene. January 2006, vol. 80, No. 1,

⁶ TANZER JM, LIVINGSTON J, THOMPSON AM. The microbiology of primary dental caries in humans. En: JDentEduc. 2001, vol. 65, p. 1028-37

epidemiológicos⁷ La participación de este microorganismo ha impulsado el interés en el conocimiento de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

Cragg y cols., 1997, estableció que los productos naturales usados durante miles de años en la medicina popular son hoy prometedores para el descubrimiento de las fuentes de nuevos agentes potencialmente terapéuticos antimicrobial⁸.

Un estudio realizado en Brasil muestra que la planta Mikania género (familia Asteraceae) una enredadera sub-matorral de ramas leñosas, conocido popularmente como "Guaco" Celeghini et al., 2001, destacada por sus múltiples propiedades farmacológicas, especialmente anti-inflamatorios, anti-alérgica, analgésico y antimicrobiana⁹.

Las drogas convencionales suelen proporcionar una terapia eficaz contra las infecciones bacterianas, sin embargo, hay un creciente problema de la resistencia a los antibióticos y una necesidad continúa de nuevas soluciones, Aunque los productos naturales no son necesariamente más seguros que los antibióticos sintéticos, algunos pacientes prefieren utilizar los medicamentos herbarios. Así, profesionales de la salud deben ser conscientes de las pruebas disponibles para los antibióticos a base de hierbas MM Fani, J Kohanteb, es así como ellos estudiaron *in vitro* la actividad inhibitoria de extracto de ajo en multiresistente (MDR) cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de humanos en dientes cariados. De los 105 dientes cariados prueba, 92 (87,6%) aislamientos de *Streptococcus mutans* fueron recuperados, entre los cuales 28 (30,4%) fueron MDR, ya que eran resistentes a cuatro o más antibióticos. La concentración mínima inhibitoria de clorhexidina (MIC) para la MDR y *Streptococcus mutans* MDR no varió de 2 a 16 mg -1 y de 0,25 a 1 mg -1, respectivamente (P <0,05). Todos los aislamientos,

⁷STRAETEMANS MM, VAN LOVEREN C, DE SOET JJ, DE GRAAFF JJ, TENCATE JM. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. En: J Dent Res. 1998, vol. 77, p.1851-5

⁸Ibid., p. 1851-4

⁹YATSUDA R, ROSALEN P.L, CURY J.A., R.M. MURATA, REHDEV.L.G. R, MELO L.V., H.KOO. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci - Journal of Ethnopharmacology. 2005, vol. 97, p. 183-189.

MDR y no-MDR de *Streptococcus mutans* fueron sensibles al ajo, extracto con el centro de control de 4 a 32 mg -1, Teniendo en cuenta los datos *in vitro* obtenidos en ese estudio, los enjuagues o pasta dentífrica que contenga la concentración óptima de ajo podría ser utilizado para la prevención de caries dental¹⁰.

RK Srikanth y cols, realizaron un estudio para evaluar el efecto de la acumulación de placa y *streptococcus mutans* cuando se utiliza en CBHE (extracto cascara de cacao) como un enjuague bucal de los niños, el enjuague CBHE fue altamente eficaz en la reducción de los recuentos de estreptococos mutans y la acumulación de la placa cuando se utiliza como enjuague bucal de los niños, Es factible poder incorporar el chocolate en goma de mascar, enjuagues bucales, y bebidas para prevenir la caries dental, Aunque no se observaron efectos secundarios durante el período de estudio, la queja común expresada por los niños fue en relación con el sabor amargo del enjuague¹¹.

Un estudio realizado por Salazar L y cols, sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro muestras de mieles, sobre los recuentos de *Streptococcus mutans*, en escolares con alto riesgo de caries dental, mostraron que según el recuento de *Streptococcus mutans* en saliva de 20 escolares, era del 45% de los escolares analizados, encontrándose entonces en la categoría de alta actividad cariogénicas. Además, se observó que el 100% de los niños presentaba *Streptococcus mutans* en su saliva, verificándose que las cuatro muestras de miel analizadas en este estudio presentaban similar actividad antibacteriana sobre estos microorganismos ($p=0,7156$) todas las concentraciones de miel investigadas (5, 15, 30 y 35%) produjeron inhibición del crecimiento de estreptococos del grupo *mutans*, en diferentes magnitudes ($p < 0,0001$), Sin embargo, las concentraciones de miel que ocasionaron una mayor reducción del número de unidades

¹⁰FANI MM, KOHANTEB J, DAYAGHI M. Inhibitory Activity of Garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. En: Official publication of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry. 2007, vol. 25, Nº 4, p. 164-168.

¹¹SRIKANTH RK, SHASHIKIRAN ND, SUBBA REDDY VV. Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. En: J Indian SocPedodPrev Dent. Jun 2008, vol. 26, Nº 2, p. 67-70.

formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* fueron 30 y 35% v/v, no existiendo diferencias significativas entre estas dos concentraciones¹².

En la actualidad existen los agentes antimicrobianos, llamados colutorios, que inhiben químicamente la formación o proliferación de la placa.

Entre estos la clorhexidina que tiene gran afinidad por las superficies dentarias y tisulares y ello sirve como depósito debido a su alta eficacia en la eliminación de microorganismos cariogénico y su sustantividad se considera el gold estándar de los antisépticos. Tanto los colutorios de aceites esenciales como los de clorhexidina penetran el biofilm bacteriano y son reactivos contra las bacterias embebidas en el mismo¹³.

Existen estudios que hacen referencias de otros aceites esenciales como el clavo de olor, albahaca y mandarina donde prometen ser antibacterianos, por ejemplo Betoni et al., 2006 en Brasil con el clavo de olor; Runyoro 2010 con la albahaca y Ayoola et al., 2008 con la mandarina; sin embargo no hay evidencias bibliográficas si la sinergia de estos tres aceites esenciales son potentes antimicrobianos como la clorhexidina.

Ahora bien el aumento de la resistencia a los antimicrobianos disponibles, llama la atención de la comunidad científica con respecto a la búsqueda de nuevas drogas rentables de origen natural o sintético¹⁴. Algunos estudios han señalado que las plantas derivadas de los aceites esenciales pueden ser una alternativa efectiva

¹²SALAZAR L; MEDINA F; DONOSO F; BARRIENTOS L; SANHUEZA A. Action In vitro Antimicrobial Activity of Honey on mutans Streptococci. En: International Journal of Morphology *version On-line*. 2009, vol. 27, p.77-82

¹³GAMBOA F; ESTUPIÑAN M; GALINDO A. Presence of *Streptococcus mutans* in saliva and its relationship with dental caries: antimicrobial susceptibility of the isolates. Universitas Scientiarum. En: revista de la facultad de ciencias Pontificia Universidad Javeriana. vol. 9, p. 23-27.

¹⁴PALOMBO Enzo A. traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. En: evidence-based complementary and alternative medicine. 2011, vol.1, p.15.

para superar la resistencia microbiana y por ende susceptible a los patógenos orales¹⁵.

La eliminación mecánica de la placa es aun la técnica más usada para evitar las enfermedades dentales y conservar la salud bucal, no obstante un mejor razonamiento de la naturaleza infectante de los padecimientos dentales revitaliza de modo notable el interés por los métodos químicos de control de la placa, sin obviar los métodos naturales que en la actualidad resultan de mucha beneficencia. El enjuague de Clorhexidina presenta, no obstante, ciertas desventajas como que puede provocar la aparición de manchas oscuras en los dientes, en la lengua y en las restauraciones, también puede alterar las percepciones del gusto hasta cuatro horas después del enjuague y en algunos casos su uso ha sido asociado con la aparición de cálculos supra gingivales¹⁶. Estos efectos no deseados que son derivados del uso regular no se han observado de forma habitual con los enjuagues a base de aceites esenciales, si bien existen algunas quejas sobre su sabor¹⁷.

Generalmente es recomendable el uso de los enjuagues después del cepillado y la limpieza interdental. No obstante con la Clorhexidina, y dado que muchos ingredientes de los dentífricos pueden reducir su eficacia antibacteriana, se recomienda eliminar totalmente cualquier resto de la pasta dental o bien esperar treinta minutos entre el cepillado y el enjuague. Los pacientes que utilizan enjuagues a base de aceites esenciales no necesitan tomar estas precauciones¹⁸.

El uso a largo plazo de los enjuagues a base de aceites esenciales ha mostrado ser seguro y sin efectos adversos en la composición microbiana de la placa supra gingival, más aun, la microflora no ha mostrado cambios en la susceptibilidad al

¹⁵ DORMAN H.J.D, DEANS S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. En: Journal of Applied Microbiology. 2000, vol. 88, p. 308–316

¹⁶ CIANCIOS. Use of mouthrinses for professional indications. En: Journal Of Clinical Management Periodontology. 1988, vol. 21, p. 59-78.

¹⁷ DEPAOLA LG, OVERHOL SERCD, MEILLERTF. Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. En: J. Clin Periodontol. 1989, vol. 16, p.311-315..

¹⁸ SANTOS A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. En: J. Clin Periodontol. 2003, vol. 30, p. 13-16.

antiséptico sugiriendo que los enjuagues de aceites esenciales no desarrollan resistencia antimicrobiana¹⁹. Una ventaja de los aceites esenciales sobre la clorhexidina usandolo a largo término, es la ausencia de efectos adversos desagradables para el paciente que le pueden dar mayor conformidad en el tratamiento²⁰.

Luego en esa búsqueda, se propone la utilización de productos naturales como solución a los problemas médicos y odontológicos, los investigadores de esta investigación plantean el siguiente interrogante ¿Cuál es la efectividad de los aceites esenciales *Eugenia caryophyllata thunberg* “clavo de olor” *Citrus tangerina* “mandarina” *Ocimum basilicum* “albahaca en comparación con un enjuague a base de clorhexidina para reducir las Unidades formadoras de colonia de *Streptococcus mutans* ?

¹⁹MINAH GE, DEPAOLALG, OVERHOL SERCD.Effects of 6 months use an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. En: J Clin Periodontol.1989, vol.16, p. 347-352.

²⁰OVERHOLSER C. Comparative effects of 2 chemotherapeutics mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. En: J Clin Periodontol.1990, vol.17, p. 575-579.

2. JUSTIFICACIÓN

La salud bucal al igual que la salud en general tiene una importancia relevante para los seres humanos, la cavidad oral es parte primordial de nuestro cuerpo, con lo cual no solo se demuestra cultura en higiene personal sino también en el estado de salud en general.

La incidencia de caries dental, gingivitis en la población infantil indica que la mayoría de los casos la higiene oral diaria podría y debería ser mejorada considerablemente. Las limitaciones de la práctica de higiene cotidianas sugieren que se necesita la aplicación de otras estrategias.

Para mantener la salud en la cavidad oral, en la actualidad existen en el mercado una cantidad considerable de antimicrobianos de diferentes marcas pero existe la necesidad de buscar uno tan efectivo como la clorhexidina, menos costoso, fácil acceso y manejo y sobre todo pocos efectos indeseables.

Por lo que este trabajo de investigación pretende evaluar la efectividad de un enjuague bucal a base de aceites esenciales sobre *Streptococcus mutans*, datos que se obtendrán a partir de pruebas microbiológicas en el laboratorio, para determinar la eficacia antimicrobiana que existe con estos productos sobre las colonias en crecimiento de bacterias que habitan la placa bacteriana.

Este tipo de trabajo es pertinente debido a que permite el desarrollo de modelos innovadores de intervención preventiva en poblaciones vulnerables así como también reviste interés para la sociedad y/o profesión Odontológica.

En tal sentido comprende un aporte de los hallazgos de conocimientos básicos que sobre el tema ha conseguido en la universidad y ofrecer información referente

para la ejecución de investigaciones preventivas tendientes a la solución del problema: caries dental y además parece razonable por tanto que estos agentes antimicrobianos coadyuven con el control de placa bacteriana junto con el control mecánico y compensar las desmotivaciones en los pacientes.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar clínicamente la efectividad de un enjuague bucal a base de aceites esenciales *Eugenia caryophyllata thunberg* “clavo de olor” *Citrus tangerina* “mandarina” *Ocimum basilicum* “albahaca” sobre placa dental y específicamente microorganismos cariogénicos como el *Streptococcus mutans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir las condiciones sociodemográficas de los sujetos.
- Evaluar la citotoxicidad de la mezcla ideal.
- Determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias que están presentes en placa dental luego de la aplicación de clorhexidina.
- Determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias que están presentes en placa dental luego de la aplicación de la mezcla de aceites esenciales.
- Comparar la eficacia de las 2 intervenciones.

4. MARCO TEORICO

La caries es una de las enfermedades más frecuentes que encontramos en cavidad oral.

La caries dental es un proceso infeccioso, localizado y transmisible que conlleva a la destrucción del tejido dental duro *Streptococcus mutans*, microorganismo normal de cavidad oral, tolerador y generador de ácidos, es considerado el principal agente causal de la caries. Diferentes estudios han demostrado la correlación y no correlación de *Streptococcus mutans* con la prevalencia de caries²¹.

4.1 CARIES DENTAL

Hacia el año 1980, Miller describió el origen microbiano de la caries dental, sin ningún impacto en su tratamiento, hasta que se inició la nueva era de investigación sobre la placa bacteriana. Anteriormente se creía que una vez instaurada la lesión seguía creciendo. Por esto las investigaciones se fundamentaron en los factores responsables del inicio del proceso.

Simultáneamente, la investigación biológica ha descubierto que el desarrollo de la placa implica una amplia gama de cambios, desde la disolución microscópica de cristales hasta el diente careado visible.

Asimismo, la aplicación de modernos cuidados sanitarios dentales implica un profundo conocimiento de la importancia relativa de los factores ambientales en la cavidad bucal que rigen el desarrollo y la progresión de la caries.

²¹GAMBOA F. Op. Cit., p. 25

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 no es unidireccional, debido a que en sus estadios iniciales el proceso puede ser detenido y una lesión de caries puede volverse inactiva.

La caries puede afectar esmalte, dentina y cemento. Las destrucciones localizadas de los tejidos duros, son 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 diente²².

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 de acogida y de origen microbiano²³.

En el microscopio electrónico la placa dental establecida es observada como una capa delgada celular y débilmente granular, sobre 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.

La primera capa acelular 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 se expone a la saliva, esta es recubierta en cuestión de segundos por una delgada película orgánica. Los

²²GARY M. WHITFORD L. WASDIN T. SCHAFER M. Plaque Fluoride Concentrations Are Dependent on Plaque Calcium Concentrations. En: Caries Res. 2002, vol. 36, N° 256, p. 265.

²³FEJERSKOV O, KLARSON BH. Dynamics of caries lesion formation. En: Fluoride in Dentistry. Munksgaard, Copenhagen. Dinamarca 1996, Cap. 11, p. 187-213.

estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que las proteínas de la saliva constituyen el elemento principal de esta película orgánica, para la absorción selectiva de proteínas salivales por el cual se forma la película²⁴.

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 aun no es conocida 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.

Hay varias apreciaciones del grosor de la película adquirida y la mayoría de investigadores están de acuerdo sobre un grosor entre unos pocos micrones por encima de 10 μ .

Una afinidad de la proteína por el hidroxapatita está relacionada a la carga de la proteína, y varios estudios han demostrado que la adición de iones influye en gran manera en el proceso de absorción.

La composición de aminoácidos en la película se caracteriza por la relativa gran cantidad de aminoácidos ácidos y neutros, mientras que la cantidad de los aminoácidos básicos y que contienen sulfuro es relativamente pequeña o falta del todo.

Los análisis de hidrato de carbono del material de la película han demostrado que más del 50 % del peso de hidrato de carbono era glucosa. Ésta es un hidrato de carbono que está presente en las glicoproteínas salivales en solo pequeñas

²⁴ibíd., p. 195-209.

cantidades. Se ha sugerido, por tanto, que la glucosa encontrada en el material de la película presenta residuos de polisacáridos extracelulares bacterianos.

Estos polisacáridos bacterianos son generalmente glucanos; por tanto, pueden muy bien ser el origen de la glucosa. Los otros hidratos de carbono presentes: la maltosa, la galactosa y la galactosamina probablemente son indicaciones de la presencia de glicoproteínas en la película. Por otra parte se han atribuido varias funciones a la película adquirida, entre las que se encuentran: protección de la superficie del esmalte, influencia en la adherencia de los microorganismos orales, como un sustrato para los microorganismos adsorbidos y formación de un reservorio de iones protectores, incluyendo el fluoruro²⁵.

Varios investigadores han demostrado que al menos parte de la película es resistente al ácido. Por tanto, es probable una cierta protección del esmalte al ácido de las bacterias y de la dieta²⁶.

La película es también resistente a las acciones abrasivas, dado que es necesario el uso de piedra pómez o cepillos duros para extraerla de la superficie del esmalte²⁷.

La presencia de un biofilm microbiano no necesariamente indica presencia de caries dental pero si es necesaria para que produzca la lesión, esto depende de la actividad metabólica de la placa sobre la superficie del esmalte asociada con factores como la fluctuación del pH de placa. Este proceso se considera inevitable y dependiente de la actividad de la placa, y su progreso desde un cambio ultraestructural hasta la cavitación, está marcada por estadios iniciales no cavitados susceptibles de remineralizarse.

²⁵Ibíd., p. 187-190

²⁶Ibíd., p. 190-200

²⁷Ibíd., p. 200-205

La lesión cariosa se origina a través de un proceso de desmineralización del esmalte dental. Dicho proceso no ocurre, inicialmente, en la superficie sino en algunas decenas de micrones por debajo de esta. La desmineralización ocurre por disolución química de las apatitas que constituyen el mineral de esmalte, como consecuencia de la difusión de ácidos orgánicos (láctico, Acético y Propionico) a través de los poros o microcanales intercrystalinos que contienen agua y compuestos orgánicos²⁸.

La atrición natural, los depósitos microbianos, los hidratos de carbono fermentables y el tiempo, son factores necesarios para desarrollar caries²⁹. Sin dejar de lado los aspectos sociales, tan necesario cuando se trata de establecerle a la caries un enfoque distinto del biológico.

Debido a que es muy difícil controlar el consumo de hidratos de carbono en los niños y otros factores intrínsecos al huésped, en el enfoque global en el tratamiento no operatorio, ha estado el manejo de la placa en el hogar pero también el profesional odontológico actúa removiéndola en las áreas de retención.

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 glicoproteínas de la película adquirida depositada en la superficie del diente, de forma casi inmediata³⁰.

²⁸Ibid.,p204-213

²⁹ K.R. EKSTRAND M.E.C. Christiansen Outcomes of a Non-Operative Caries Treatment Programme for Children and Adolescents. Department of Cariology and Endodontic, Dental Faculty, University of Copenhagen, Copenhagen and Public Dental Health Service, Municipality of Nexø, Nexø, Denmark. En: Caries Research. 2005, vol.39, p. 455–467.

³⁰ GUILARTE, C. y PERRONE, M. Microorganismos de la placa dental relacionados con La Etiología de la Periodontitis. En: Acta odontol. Venez. 2004, vol. 42, N° 3, p.213-217. ISSN 0001-6365.

Streptococcus sanguis, es el primer microorganismo que es adherido a la superficie de la película adquirida y como tal, inicia la colonización microbiana en la formación de placa dental supragingival e inmediatamente el *Actinomyces viscosus*. éstos 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 prerrequisito para la colonización posterior de especies de *Veillonella ssp.* y *Fusobacterium ssp.*

Otras bacterias que inician el proceso de colonización son *Streptococcus ssp* del grupo *oralis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces ssp*, *Neisseria ssp*, y *Haemophilus ssp*³¹.

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 Autogénica³².

Investigaciones realizadas refieren que los microorganismos secundarios que se adhieren a las bacterias presentes en la masa de la placa son *Prevotellascheii*, *P. intermedia*, *Capnocytophaga ssp*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porfiromonas gingivalis*; dichas bacterias se adhieren a otras bacterias ya presentes en la masa de la placa dental³³.

Un aspecto que juega un papel preponderante en el crecimiento y posterior maduración de la placa dental, es el fenómeno de Coagregación entre células

³¹Ibid., p. 215

³²Ibid., p. 215

³³KOLENBRANDER P, PHUCAS C. Effect of saliva on coaggregation of Actinomyces and Streptococcus species. En: Infect Immun. 1984, vol. 44, p. 228 – 233.

microbianas, en el cual la adherencia de nuevos microorganismos se realiza sobre la primera capa de estos ya unidos a la superficie del diente. Estas interacciones suceden específicamente a través de proteínas de tipo lectinas y menos específicas resultantes de las fuerzas hidrófobas, electrostáticas y de Van der Walls³⁴, Se han descrito coagregaciones entre *Streptococcus sanguis* con *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Corynebacterium matruchotii* y *Fusobacterium nucleatum*, entre *P. loescheii* con *Actinomyces viscosus* y entre *Capnocytophaga ochracea* con *Actinomyces viscosus*. También entre especies Gram positivas como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, con *Corynebacterium matruchotii* o con *Propionibacterium acnes*; entre especies Gram positivas con Gram negativas como *Streptococcus ssp*, *Actinomyces ssp*, con *Prevotellasp* y *Porphyromonasp*., *Capnocytophagasp*., *Fusobacterium nucleatum*, *Eikeinella corrodens*, *Veillonellasp*., y entre especies Gram negativas como *Prevotella melaninogenica* con *Fusobacterium nucleatum*³⁵.

En la cavidad bucal se han aislado *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinosus* y *Streptococcus oligofermentans*. De todas estas especies *Streptococcus mutans* ha sido la más estudiada³⁶.

Entre los factores de patogenicidad presentes en *Streptococcus mutans*, están:

a) poder acidógeno, acidófilo y acidúrico b) síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles, y fructanos c) síntesis de polisacáridos intracelulares d) capacidad adhesiva por las proteínas salivales, que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, y capacidad agregativa y coagregativa a través de mútanos y glucosiltransferasas y proteínas receptoras de

³⁴FEJERSKOV O. Op. cit., p. 191.2004

³⁵GUILARTE, C. y PERRONE. Op. Cit., 213-217

³⁶BECKER MR, PASTER BJ, LEYS EL, MOESCHBERGER, KENYON SG, GALVIN JL, BOCHES SK, DEWHIRST FE, GRIFFEN AL. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. En: J Clin Microbiol. 2002, vol. 40, N°3, p. 1001-1009.

glucanos y e) producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos. La habilidad de *Streptococcus mutans* de sintetizar glucanos insolubles, a partir de la sacarosa de la dieta, a través de las glucosiltransferasas, facilita la formación de la biopelícula dental³⁷.

Se ha demostrado que *Streptococcus mutans* está implicado en el inicio de la lesión de caries, mediante estudios realizados en animales de experimentación, entre los que se destaca el estudio de Fitzgerald y Keyes, en 1960, quienes demostraron el papel de *Streptococcus mutans* como agente microbiano cariogénico en caries experimental en hámster. También, quedó demostrada la presencia de altos números de *Streptococcus mutans* en humanos, en las muestras de placa dental en el sitio sobre lesiones de caries iniciales de mancha blanca³⁸. Además, van Houte, en 1994, señaló que *Streptococcus mutans* constituye una alta proporción de la flora cultivable antes y durante el inicio de la lesión de caries³⁹.

Kleinberg, en 2002, observó que individuos con altos contajes de *Streptococcus mutans* no necesariamente desarrollan lesiones de caries⁴⁰. Por otra parte, Okada y col, observaron que *Streptococcus sobrinus* es más acidogénico y más acidúrico que *Streptococcus mutans*, y la coexistencia de ambas especies es un factor determinante en el desarrollo de caries⁴¹.

³⁷TONG H, GAO X, DONG X. *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. En: Int J SystEvol Microbiol. 2003, vol. 53, p. 1101-1104

³⁸MINAH GE, LOESCHE WJ. Op. cit., p. 55-61.

³⁹VAN HOUTE J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. En: J Dent Res. 1994, vol. 73, N°3, p. 672-681.

⁴⁰KLEINBERG I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and specific-plaque hypothesis. En: Crit Rev Oral Biol Med. 2002, vol. 13, p. 108-125.

⁴¹OKADA M, SODA Y, HAYASHI F, DOI T, SUZUKI J, MIURA K, KOSAI K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from pre-school children. En: J Med Microbiol. 2002, vol. 51, p. 443-447

4.4 ACEITES ESENCIALES

Los Aceites Esenciales (AE) o esencias vegetales son líquidos de naturaleza oleosa y volátil obtenidos de fuentes naturales en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter, aceites vegetales y minerales

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 patologías⁴², 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 *Piptobetula*, de reconocida actividad antifúngica⁴³, nos aporta una idea del conocimiento empírico por parte del poblador de aquella época sobre el beneficio que producía el consumo de algunas plantas.

El primer tratado Helénico completo en materia de plantas medicinales del que se tiene conocimientos fue redactado por Diocles de Carystos (siglo IV D, C.). El tratado llamado *Phytognomon*, expone el origen, el reconocimiento y valor médico de diversas plantas⁴⁴.

Probablemente una de las primeras drogas tradicional que se transformó en una droga allá a finales del siglo XVIII, fue la digital (*Digitalis purpurea*) lo cual representa la farmacología moderna⁴⁵ es oportuno mencionar que, entre las más

⁴²HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and cross-cultural usage patterns. En: Ann. Epidemiol. 2005, vol. 15, N° 9, p. 686-99.

⁴³CAPPASO L.A. 5300 year's ago. The Ice Man Use Natural Laxative and Antibiotics. En: Lancet. 1998. vol. 352, N° 5, p. 1864

⁴⁴SHIVA C.M Y CALVO M.A. Aspectos sobre la capacidad antibacteriana de extractos naturales y ácidos orgánicos. En: Anales de la Real academia de doctores de España. 2003, vol. 7, p. 121-129

⁴⁵GOLDMAN P. Herbal Medicine Today and Root of modern pharmacology. En: Ann Intern Med. 2001, vol. 135, N° 18, p. 594-00

antiguas actividades del ser humano está el estudio de plantas, en particular como fuentes de alimento. Siempre, el hombre ha tenido 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. 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 antimicrobianos⁴⁶ pero se conocen más de 250000 especies de plantas que contiene una gran diversidad de componentes bioactivos.

Es destacable 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 están todos sus compuestos que cuando se encuentran purificado, este fenómeno llamado buffering⁴⁷.

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 cumarina⁴⁸, los mecanismos exactos de acción de los extractos naturales aún no se conoce de forma exhaustiva, pero es sabido 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 integridad.

⁴⁶GOULD G.W. Industry Perspectives on the use of natural antimicrobial and inhibitors for food applications. En: J. FoddProl (supl). 1996. p. 82-86

⁴⁷POPPEENGA R.H. Risk associated with the use of herbs and other dietary supplements veterinary. En: Clin North Am Equine practice. 2001, vol. 17, N°3, p.455-77.

⁴⁸CALVO M.A, ANGULO E, COST-BATLLI, SHIVA P, ADENLANTADOC, VICENTE A. Natural plant Extract and Organic Acids: Synergism and implication an piglets intestinal microbiota biotechnology. 2006, vol.5, N°2, P. 137-142

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.

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 incremento de las aplicaciones terapéuticas de las plantas, una recuperación de su uso.

En el ámbito odontológico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de los programas preventivos y curativos han estimulado la investigación con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos extractos de plantas cuyo objetivo de ayudar en el control de la placa bacteriana y por consiguiente en la disminución de la caries dental y por qué no de la enfermedad periodontal.

La eficacia de algunos principios activos de origen natural ha quedado demostrada, como es el caso de la acción vasodilatadora del *Ginkgo Biloba* y las propiedades antidepresivas de la conocida como hierba de San Juan o *Hypericum*⁴⁹.

⁴⁹ALONSO, J. Tratado de Fitofármacos y nutracéuticos. En: Rosario: Editorial Hábeas. 2004, p. 120-124.

La medicina natural aunque ha sido utilizada como tratamiento médico general desde hace muchos años, es muy poco conocida como posible aporte al ámbito odontológico.

En los últimos años 10 años se ha publicado una serie de artículos que nos permiten actualizarnos en las investigaciones realizadas de los extractos naturales usados en la actividad antimicrobiana en microorganismos cariogénicos. El 5 de octubre en la revista de odontología de San Marquina publicó un artículo de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* cuyo objetivo fue evaluar la eficacia de este producto, se evaluaron las cepas *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* para relacionarlas más soluciones: 0,8, 20 y 30 % de extracto etanólico de propóleo y compararla con la clorhexidina al 0,12% (como referente) y alcohol al 70% (como negativo), teniendo como resultado que *Streptococcus mutans* tuvo mayor actividad, es inversamente proporcional a su concentración, en el caso del *Lactobacillus casei* la acción antibacteriana en las concentraciones del 0,8, 20 y 30 % es significativa en comparación con el testigo, concluyendo que la acción antimicrobiana de extracto etanólico de propóleo en solución al 0,8% tiene mejor acción antibacteriana que la clorhexidina al 0,12%, en cambio la acción antimicrobiana contra el *Streptococcus mutans* es mayor que la del *Lactobacillus casei* en las concentraciones de 0,8 y 20%⁵⁰.

Siguiendo las investigaciones de extractos naturales se realizó un estudio sobre el efecto del té verde al 10 % en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans in vitro*, usándose cepas de *Streptococcus mutans*, luego realizó una infusión del té verde al 10%. sembró la cepa en caldo tripticosa de soya (CTS) incubada a 37°C en 24 horas, a partir de este momento nuevamente sembró 1ml en dos tubos con 9 de caldo sacarosa al 5% los resultados fueron satisfactorios donde los cultivos de *S. mutans* con la infusión del té verde

⁵⁰EGUIZÁBAL Marly A. MORONI NAKATA Hilda. Actividad Antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre el *Streptococcus Mutans* y *Lactobacillus Casei*. En: Odont San Marquina. 2007, p. 18-20.

mostraron poca formación de la placa bacteriana los residuos formados tenían muy poca adherencias con desprendimiento rápido.

Los polifenos del té verde se consideran inhibidores de adherencia de la placa bacteriana por disminución de la hidrofobicidad del *Streptococcus mutans*, el extracto puede inhibir la actividad de los microorganismos cariogénicos por la reducción en la producción de ácidos, en conclusión el té verde puede ser usado como una alternativa en la prevención de la formación de placa dental⁵¹.

Otro estudio de extractos naturales, fue realizado sobre la actividad de los extractos vegetales que contienen polifenoles contra el *Streptococcus mutans*, el objetivo fue evaluar las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de propánona en solución acuosa al 70% para ver el contenido de polifenol sobre el *Streptococcus mutans* y otras bacterias, se usó la técnica de dilución en agar para ver la susceptibilidad como agente anticariogénico y los efectos sobre la adhesión del *Streptococcus mutans* al vidrio. Con los resultados obtenidos, la concentración mínima inhibitoria más bajas fueron para los extractos de la piel de una uva roja (0,5mg/) y del té verde y la piel de endrina (2mg/), Los extractos comerciales tuvieron una actividad de la concentración mínima inhibitoria de 2 mg/ para los extractos de té verde, extractos de semillas de uva y Pynogenol (extracto de pino) todos los demás extractos tuvieron una CMI de mayor o igual del 4mg/.

El cacao no fermentado tuvo una actividad antimicrobiana mayor que el cacao fermentado, la actividad del extracto fraccionado aumento con la magnitud de polimerización de epicatecina. Este polímero tuvo una concentración mínima inhibitoria de 1mg/, los extractos fueron probados contra otras especies orales y tuvieron efectividad contra especies gram positivas, se concluye que los extractos del cacao fermentado, la fracción de epicatecina, té verde y las semillas de uva

⁵¹MOROMI NAKATI Hilda. Efecto del Té verde en la formación de la placa bacteriana por el *Streptococcus Mutans*. En: Odontol. Sanmarquina.2006. vol.9, N°2.

roja fueron bacteriostáticos que evitaron la producción de ácido cuando fueron adicionadas las CMI a los cultivos *Streptococcus mutans* al vidrio⁵².

Consecuentes a estas investigaciones se están comparando aceites esenciales con la clorhexidina, es así como Himratul Aznita y cols, hacen referencia de la eficacia de la clorhexidina, hexetidina extractos *Eugenia caryophyllus* comercializados en enjuagues orales para reducir la placa dental. El estudio se realizó con el objetivo de comparar la eficacia de compuestos antimicrobianos en la comercialización de enjuagues bucales, clorhexidina (Oradex), hexetidina (Bactidol) y *Eugenia caryophyllus* (clavo) extractos (MustikaRatu) en el control de los números de microbios de la placa dental y determinar la duración de los efectos en los microorganismos en la placa y la supresión de la reducción con el uso de los enjuagues bucales seleccionados. El efecto antibacteriano de todos los enjuagues orales fueron evaluados en adultos sanos, que no estaban en ningún tipo de tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses y han sido probadas en voluntarios por un período de intervalo de 30 minutos para un máximo de 90 minutos. Los voluntarios tuvieron que suspender normales hábitos de higiene oral y en el día de muestreo, la superficie de los dientes expuestos de cada voluntario se tomó muestras de la superficie de los dientes con un hisopo, se diluyeron en serie y agar BHI. El estudio mostró que, inmediatamente después de utilizar los enjuagues orales respectivos, la clorhexidina fue más eficaz que hexetidina y extracto *Eugenia caryophyllus* en la reducción de la carga microbiana y el mantenimiento con mayor duración en el control de la acumulación de microbios. Por otra parte, *Eugenia caryophyllus* actuó más rápido que demostrado exhibir efecto de más corta duración en la placa⁵³ pero también vemos en estudios sus efectos adversos, asociados con el uso de clorhexidina, donde mostraron que 31 % de los sujetos que usaron el enjuague tuvieron efectos adversos que fueron cambios de sabor en un 19,3% y manchas en los diente, lengua y dentaduras en

⁵²SMULLEN G.A, KOUTSOU H.A, FOSTER A, ZUMBE. Actividad antibacteriana de los extractos vegetales que contienen polifenoles contra el *Streptococcus Mutans*. En: Biomedical Science Research Manchester. 2007.

⁵³HIMRATUL AZNITA W H, ZAINAL-ABIDIN Z, AZNAN E, RAZI M.N. The Effectiveness of Chlorhexidine, Hexetidine and caryophyllus extracts in Commercialized Oral Rinses to reduce Dental Plaque Microbes. En: Research journal of biological sciences. 2009, vol.4, N.º6, p. 716-719.

un 18,6% e irritación 7,1%, dificultad para respirar y sibilancias 7,1%, donde sacan por conclusión que el uso de la clorhexidina debe ser monitoreado por sus efectos adversos⁴⁵ sin embargo se ve que con estos aceites esenciales de nuestra investigación se sabe de sus múltiples beneficios médicos pero su posible uso como bacteriostático de la principal bacteria implicada en la formación de placa dentobacteriana, no reúne mayores referencias. He allí donde se pretende consolidar este aporte a la investigación y por ende al medio Odontológico.

Dada la escasez de investigaciones científicas en el área temática, la presente investigación podrá brindar una alternativa de elección en la inhibición de placa dentobacteriana y por consiguiente una alternativa en la prevención y tratamiento de las patologías más frecuentes de la cavidad bucal.

Ahora bien la problemática se ha controlado por la utilización de sustancias químicas como el tricloxan, clorhexidina y fluoruro de sodio, los cuales son eficaces para inhibir esos patógenos, sin embargo el uso indiscriminado altera la flora benéfica oral y produce resistencia bacteriana⁵⁴. De esta forma se hace necesario buscar alternativas vegetales, ya que según antecedentes históricos tiene respuestas antimicrobianas y ofrecen similar efectividad que los antimicrobianos comerciales y a la vez no perjudica la salud del paciente. Esta situación nos brinda la oportunidad de estudiar el uso de aceites esenciales, específicamente, mandarina, clavo de olor y albahaca como sustancias antimicrobianas.

Los métodos usados para evaluar los extractos de plantas sobre bacterias pueden ser determinados por dos métodos sencillos y rapidez.

La técnica de difusión en disco de agar y por dilución en medio líquido de cultivos y en agar ambos métodos nos permiten conocer datos cuantitativos⁵⁵.

⁵⁴ MARSH P.D. Contemporary perspective on plaque control. En: British Dental Journal. 2012, vol. 212, p. 601-606.

⁵⁵ TOIT, E.A Y RAUTENBACH, M. A. Sensitive Standardized Micro gel well Diffusion Assay for the Determination of Antimicrobial Activity. En: J. Microbiol. Methods. 2000, vol. 42, p. 159-65

4.5 MÉTODOS EN AGAR

Es el método de difusión por discos, basados en la metodología usados por Bauer. El principio del método involucra la aplicación de una determinada cantidad de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato (disco de papel) en la superficie del agar en la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio, donde formará un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del organismo está dada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

También se usa el dilución en agar donde se incorpora el producto a evaluar en un medio con agar, el producto se añade cuando el medio aun esta líquido para logara el rango de dilución se prepara una serie de placas cada una con una determinada concentración del producto, las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo ,los resultados de la dilución con agar se expresa en concentración inhibitoria mínima (CMI)⁵⁶.

El otro método es el medio de cultivo líquido, basándose en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del aceite esencial, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo).

El uso de micro-pipetas y placas de micro-titulación facilita el uso del método de micro-dilución en caldo, se preparan diluciones del producto a evaluar usando u medio de cultivo adecuado, posteriormente se inocular dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando que concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Los medio usados son el MHB (caldo Mueller Hinton), NB (caldo nutritivo) y TSB (caldo tripticasa soya) y en ocasiones sueros⁵⁷.

⁵⁶Ibid. p. 159-65.

⁵⁷Ibid., p. 159-65

4.5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana es la capacidad que poseen algunas sustancias de actuar contra las bacterias, ya sea produciendo la muerte del microorganismo (bactericida) o inhibiendo el crecimiento del mismo (bacteriostático) (Flórez,1998).

4.5.2 Concentración mínima inhibitoria

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba, Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano, Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la dilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos.

En la determinación de la CMI mediante el método de dilución en caldo, al ir disminuyendo la concentración del antimicrobiano es observado que no hay desarrollo del microorganismo por la ausencia de turbidez, hasta llegar a un tubo a partir del cual comienza a haber un aumento de turbidez y por tanto, desarrollo bacteriano,(Coyle,n,d,)

Otro concepto es la concentración inhibitoria mínima que es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación repentina, Las concentraciones inhibitorias mínimas son importantes como diagnóstico de laboratorio para confirmar la resistencia de un microorganismo para un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de nuevos agentes antimicrobianos⁵⁸.

⁵⁸ ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. En: Journal of Antimicrobial Chemotherapy .2001, vol. 48, p. 5-16.

La unidad formadora de colonia es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible. Las UFC pueden ser pares (diplococos), cadena (*Streptococcus*) o racimos (*Staphylococcus*), así como células individuales formadora de colonias⁵⁹.

⁵⁹GERARD J, TORTORA Berdell R, FUNKE Christine L. Case Microbiología. 9ª edición Panamericana.2007, p.178-179.

5. METODOLOGIA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Ensayo clínico controlado a doble ciego, donde se seleccionaron 32 niños divididos en forma aleatoria en dos grupos. Al grupo uno le aplicaron el enjuague clorhexidina (sustancia control) y al otro grupo el enjuague experimental de aceites esenciales (mezcla ideal). Se recolectó placa bacteriana de los órganos dentarios de 16 participantes usándose como control negativo.

5.2 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

El estudio” efectividad de un enjuague bucal a base de aceites esenciales *Eugenia caryophyllata* Thunberg “clavo de olor” *Citrus tangerina* “mandarina” *Ocimum basilicum*”albahaca” sobre placa dental y específicamente microorganismos cariogenicos como el *Streptococcus mutans* en la Universidad de Cartagena postgrado de Odontopediatría, la población total de la muestra está constituida por 60 niños con edades entre 8 y 10 años de la Escuela José María Córdoba del barrio Nuevo Bosque, de éstos solamente quedaron 32 porque cumplían con los criterios de inclusión que fueron niños con placa bacteriana y que tuvieran en un rango de edad entre 8 y 10 años, 28 fueron excluidos porque no que cumplieron con los criterios de inclusión de nuestro estudio.

La muestra entonces quedo constituida por 32 niños los cuales fueron escogidos según los criterios de selección y luego se asignaron a los grupos en forma aleatoria, al igual que lo hizo (Verónica Cárcamo O, hecho en Chile en el 2006)⁶⁰. donde recluto 32 pacientes para determinar la efectividad antimicrobiana

⁶⁰CARCAMO, O. V.; OLIVA, M. P. & GONZLEZ, C. P. Efectividad antimicrobiana del colutorio de Matricaria recutita, en funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo, Chile. En: Int. J. Odontostomat. 2011, vol.5, N°.2, p.179-184.

del colutorio de Matricaria Retutica en Funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile

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 producción de caries (Matiz m, German y col)⁶¹. 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* (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* (Albahaca) tienen un efecto marcado sobre el resultado final con una MIC de 425 ppm. Por esta razón fueron seleccionados para conformar la mezcla ideal y luego medir su actividad.

Los materiales constituyentes son adquiridos en una industria con alto nivel de calidad para obtener una veracidad en la materia prima, es por esta razón que se compraron en la INDUSTRIA QUIMICA GREEN ANDINA UNIDAD DE NEGOCIOS de la ciudad de Bogotá.

Posterior a esto en la facultad de Química y Farmacia en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica y Cosmética de alimentos es preparado el enjuague

⁶¹MATIZ G, CARMONA L. Evaluación de actividad antimicrobiana de mezclas de aceites esenciales sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, bacteria implicada en la producción de caries. Cartagena 2011.

ideal tomando de cada uno de los aceites a una concentración de 400 ppm 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 de etanol grado reactivo, Esta solución stock se diluyó 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.

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 estreptomina, a 37°C y 5% de CO₂, Las células en crecimiento exponencial, fueron desprendidas y resuspendidas, Para realizar el conteo de macrófagos presentes, fue utilizado azul de trypan y cámara de Neubauer, Finalmente se ajustó la concentración para obtener una densidad de 2 x10⁶ células.

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, El Tritón X-100 (20%) fue utilizado como control positivo, Seguidamente se adicionó una solución de MTT (0,25 mg/l) y se incubó por 4 horas más. Transcurrido este periodo fué solubilizado 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)⁶².

⁶²MANOSROI J, SAINAKHAM M, MANOSROI W, MANOSROI A. Anti-proliferative and apoptosis induction activities of extracts from Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. En: Journal of Ethnopharmacology. 2012, vol.141, N°.1, p.451-459.

Los resultados se expresaron como la media, 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.

Para toma de muestra se realizó un listado con los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión para nuestro estudio, se digitaron en el programa Excel y fue realizada la selección en forma aleatoria de los mismos por medio de una persona independiente a la participación del estudio.

Luego los pacientes seleccionados fueron reunidos con sus acudientes (padres) se les explicó el procedimiento que se realizaría, como contraprestación es entregado un kit de higiene oral y una profilaxis en los niños, luego es hecha la toma de impresiones para la elaboración de la placa de hawley de cada uno, en cual es colocada una porción de esmalte humano en la parte correspondiente al paladar la cual se obtuvo de dientes recién extraídos, con el fin de aplicar en ella las soluciones de enjuagues⁶³. Durante 8 días se reunían diariamente los dos grupos de niños con el fin de aplicarles 1 gota de la solución experimental en la capa de esmalte al grupo correspondiente y 1 gota de solución control en la capa de esmalte al grupo correspondiente a esta, 0,5 minutos eran dado como espera y luego se aplicaba agua sobre la placa sin realizar barrido con la finalidad de que se impregnaran las soluciones y existiera un mínimo contacto con la mucosa oral de cada paciente, luego con sondas periodontales estériles es recolectada la placa de los segmentos de esmalte embebidas en la placa de hawley y de los dientes de los participantes; previamente se esterilizaron tubos eppendorf y a cada uno se le aplico 1ml de solución salina estos fueron enumerados con el fin de no presentar confusión y pesados en una balanza digital calibrada(KEREN de Alemania).Una vez obtenida la placa y colocada dentro del tubo eppendorf con solución salina es pesada nuevamente para determinar la cantidad de placa

⁶³MEDINA Rosalba et al. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación Del Streptococcus mutans ATCC 25175 "in vitro". En: NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. JUNIO DE 2005, vol.3, No. 3 ENERO, p.1-120. ISSN: 1794-2470.

bacteriana que se obtiene para no alterar la cantidad de UFC de una muestra con otra.

Se lleva al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena y se somete primero a un proceso de dilución, luego el procedimiento de siembra en una cabina de flujo laminar (ESCO de Singapore), (figura 1); para ello los tubos marcados con cada uno de la identificación de los pacientes son zonicados (ELMA de Alemania) con una amplitud del 5% a 40w, 5 pulsos en 0,9 segundos, para unificar la suspensión bacteriana (figura 2), de esta se extrae con una micropipeta y puntas estériles 0,2 para ser sembrados por agotamiento en las cajas de Petri marcadas con las mismas numeraciones de los pacientes que contenían TSY 20B, medio específico para el crecimiento del *Streptococcus mutans*⁶⁴. (figura 3)

Luego es llevada a una jarra de anaerobiosis con un sobre de anaerogen la totalidad de las cajas de Petri con dicha siembra (figura 4) y se incubaron (PRECISION) por un tiempo de 48 horas a una temperatura de 37°C para el crecimiento de las colonias, colocando cada caja de petri en el esteromicroscopio por uno de los investigadores calibrados y se procedió a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans*, (figura 5) así como lo referencia Himratul en el 2009 con su estudio de “Efectividad de la clorhexidina, hexetidina, extracto de *Eugenia caryophyllata* Thunberg en enjuagues orales comerciales para la reducción de placa bacteriana”⁶⁵.

5.3 PLAN DE ANÁLISIS

Para el almacenamiento, organización, procesamiento y reducción de los datos se construyó una matriz en Excel versión para Windows 2007. Previo a estos análisis se probaron los supuestos de normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk), homocedasticidad (prueba de Levene) y de independencia, mediante análisis

⁶⁴Ibid., p.1-120

⁶⁵HIMRATUL Aznita y cols. Op. cit., p. 716-719

gráfico de los residuos con el fin de corroborar que los datos eran normales para poder elegir la prueba de hipótesis (Montgomery, 2004⁶⁶) (ver anexo) Posteriormente los datos restantes de cada tratamiento se transformaron mediante la función raíz cuadrada, para poder cumplir con uno de los supuestos del análisis de varianza (ANOVA), el cual se empleó de forma a una vía (tratamiento bucal). La significancia de las diferencias entre cada tratamiento se comprobó mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%. El análisis de los datos se efectuó con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

5.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se tuvo en cuenta la resolución 8430 de 1993 y se realizó un consentimiento informado para los padres con el fin de explicarles los objetivos del proyecto, ventajas de pertenecer al estudio y se aseguró la no existencia de riesgos a la salud mediante prueba de citotoxicidad al enjuague experimental a base de aceites esenciales y el aval del comité de ética institucional.

⁶⁶ Montgomery Douglas C. Diseño y análisis de experimentos. Segunda Edición. Ed. LimusaWiley. México D. F. 2004. 686p

6. RESULTADOS

6.1 DISTRIBUCIÓN DE VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS.

El análisis hecho a los resultados obtenidos de las mediciones tomadas a 32 participantes seleccionados quedaron 26 (posterior a la eliminación de los datos atípicos) entre los 8 y 10 años de edad, nos muestra lo siguiente:

La edad más frecuente fue de 9 años con un porcentaje de 46.1%, seguido de la edad de 10 años con un porcentaje de 38.4%. Con respecto al sexo se encontró un mayor frecuencia para el sexo masculino correspondiente al 53.8%, el 46.1% correspondió al sexo femenino (Tabla 1).

Tabla 1. Características socio-demográficas de los participantes

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
SEXO		
Femenino	12	46,15
Masculino	14	53,84
EDAD		
8	4	15,38
9	12	46,15
10	10	38,46

6.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS ENJUAGUES APLICADOS A LOS PARTICIPANTES.

Para los enjuagues bucales, el 50% de los participantes fueron distribuidos con Aceites esenciales, y el 50% restante se les distribuyó enjuague de Clorhexidina (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los enjuagues aplicados a los participantes

Enjuague	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Aceites esenciales	16	50
Clorhexidina	16	50

6.3 EFECTO DE LA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264,7.

Al observar los resultados obtenidos de la prueba citotoxicológica se encontró mayor significancia estadística en la toxicidad de la mezcla de aceites esenciales a concentraciones mayores a 62,5 $\mu\text{g/}$ para los macrófagos RAW 264,7 y CL_{50} de 572,78 (522,88-626,49) $\mu\text{g/}$ (Figura 1).

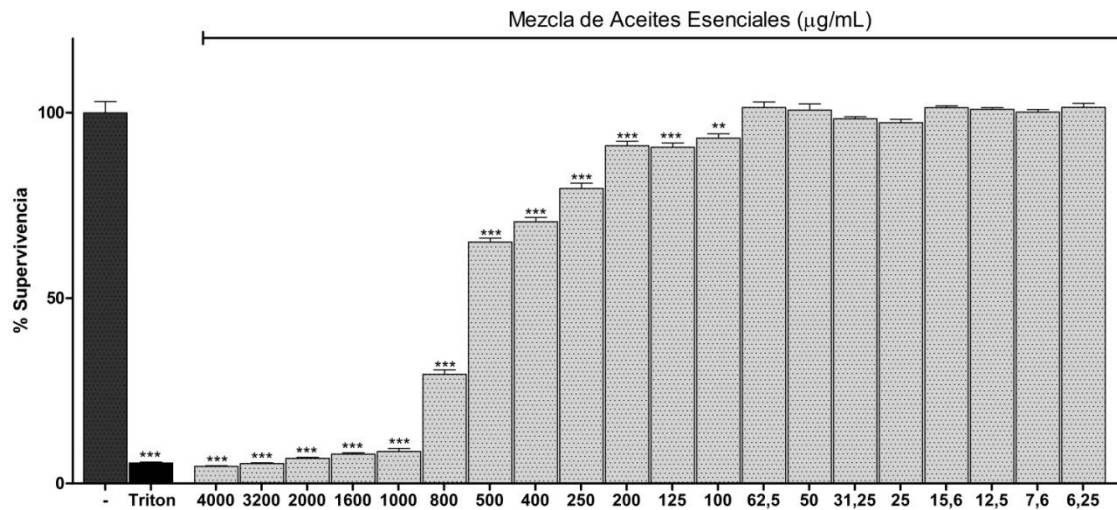


Figura 1. Efecto de la mezcla de aceites esenciales sobre macrófagos RAW 264,7,

Cada valor representa la media \pm ESM ($n=6$), ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, comparados al grupo sin tratamiento,

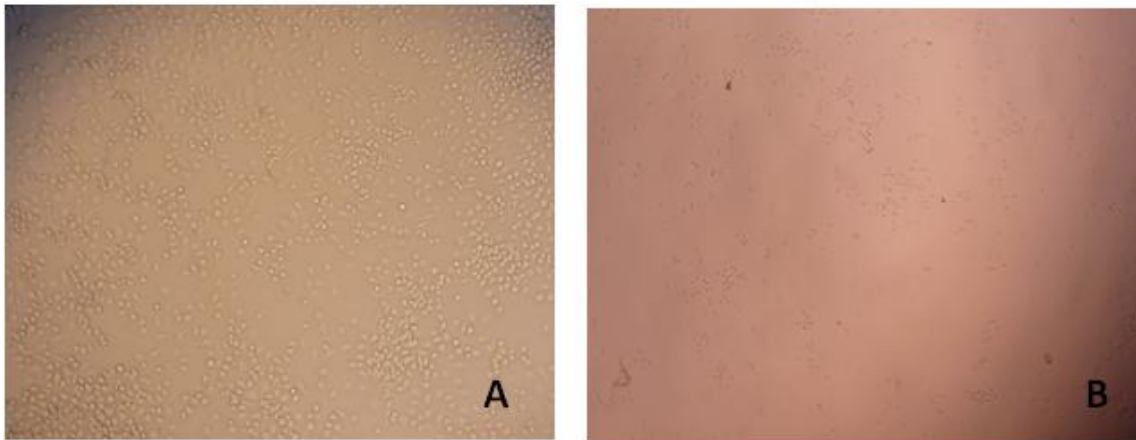


Figura 2. Comparación de la morfología de células de la línea RAW 264,7 (A), al ser tratados con la mezcla de aceites esenciales en estudio a 4000 µg/ml (B), Imágenes con aumento 10X,

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 µg/ 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)

6.4 VARIABILIDAD EN LA CANTIDAD DE PLACA DENTAL OBTENIDA DE LOS DOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Al comparar los dos grupos se pudo observar que la variación de la cantidad de la placa en términos porcentuales de una muestra a otra es solo del 1,6% en el enjuague de aceites esenciales y del 2,4% en el enjuague control, por lo cual no existió diferencia significativa para la obtención de las unidades formadoras de colonias de *S. mutans* (tabla 3).

Tabla 3. Variabilidad en la cantidad de placa dental obtenida de los dos grupos de estudio

Códigos grupo 1	Aceites esenciales	Códigos grupos 2	Clorhexidina
Tubo 1,1	0,999	Tubo 2,1	0,984
Tubo 1,2	1,02	Tubo 2,2	1,051
Tubo 1,3	1,023	Tubo 2,3	1,008
Tubo 1,4	0,975	Tubo 2,4	1,014
Tubo 1,5	0,987	Tubo 2,5	1,031
Tubo 1,6	0,992	Tubo 2,6	1,034
Tubo 1,7	1,014	Tubo 2,7	1,045
Tubo 1,8	1,024	Tubo 2,8	0,972
Tubo 1,9	1,01	Tubo 2,9	0,977
Tubo 1,10	1,016	Tubo 2,10	1,008
Tubo 1,11	1,008	Tubo 2,11	0,998
Tubo 1,12	1,005	Tubo 2,12	1,021
Tubo 1,13	0,996	Tubo 2,13	0,993
Tubo 1,14	1,041	Tubo 2,14	1,047
Tubo 1,15	1,017	Tubo 2,15	0,998
Tubo 1,16	1,008	Tubo 2,16	1,009
Promedio PD	1,0084375	Promedio PD	1,011875
Desviación Estándar	0,01615743	Desviación Estándar	0,02472212

6.5 RESULTADO UFC STREPTOCOCOS MUTANS

Al comparar las UFC de cada grupo se encontró que la mayor cantidad de colonias para el grupo de enjuague de Aceites esenciales fue de 650.000 UFC u/mL, en el grupo de enjuague con clorhexidina (control positivo) la mayor cantidad de colonias fue de 580.000 UFC u/mL, así mismo la mayor cantidad de colonia para el grupo control (negativo) fue de 2'730.000 UFC u/mL.

Tabla 4. Resultado UFC Streptococosmutans

	ENJUAGUE	CLORHEXIDINA	CONTROL
numero	U.F.C. u/mL	U.F.C. u/mL	U.F.C. u/mL
1	630000	525000	2646000
2	575000	400000	2415000
3	615000	375000	2583000
4	550000	510000	2310000
5	505000	475000	2121000
6	630000	300000	2646000
7	610000	545000	2562000
8	620000	580000	2604000
9	605000	435000	2541000
10	600000	360000	2520000
11	650000	370000	2730000
12	550000	560000	2310000
13	505000	490000	2121000

6.6 COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LAS UFC PARA LOS TRATAMIENTOS BUCALES

Al comparar los valores de las UFC, para los dos tratamientos bucales y su respectivo control, se encontró que estos presentan diferencias estadísticamente significativas con un valor de P menor a 0,05 (Tabla 5). Los valores medios de la UFC fue menor en el grupo de enjuagues con clorhexidina mostrando un valor entre 600 y 700 SQR (UFC) ug/mL(Figura 3.).

Tabla 5. Comparativo de los valores de las UFC para los tratamientos bucales tabla ANOVA para sqrt (UFC) por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razon-F	Valor-p
Entre Grupos	6,33763E6	2	3,16881E6	992,07	0,0000
Intra Grupos	114989,	36	3194,14		
Total(Corr.)	6,45262E6	38			

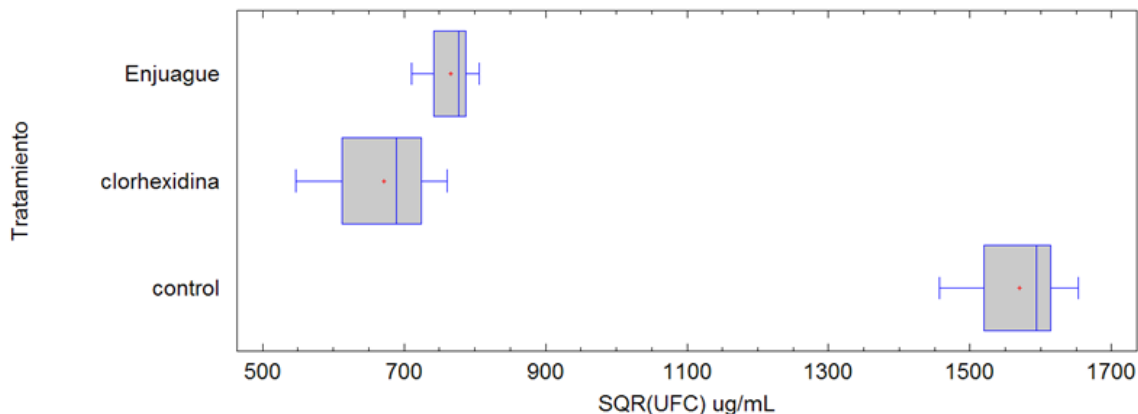


Figura 3. Gráfico de cajas y bigotes en el que comparan los valores medios de las UFC de cada tratamiento bucal.

6.7 COMPARACIÓN DE RANGOS MÚLTIPLES DE LOS VALORES MEDIOS DE LAS UFC, ENCONTRADOS EN CADA TRATAMIENTO EXPERIMENTAL.

Al comparar los rangos múltiples de los valores medios de las UFC (prueba de comparación de rangos múltiples de Tukey, transformados mediante la función raíz cuadrada) se encontró entre el enjuague de aceites esenciales y la clorhexidina una diferencia estadísticamente significativa de 94,238, de igual manera se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar enjuagues de Aceites esenciales con el grupo control(-804.118), y clorhexidina con el grupo control(-898.356) (Tabla 6.)

Tabla 6. Comparación de rangos múltiples de los valores medios de las UFC, encontrados en cada tratamiento experimental. Metodo : 95,0 porcentaje Tukey HS

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Clorhexidina	13	672,034	X
Enjuague	13	766,272	X
Control	13	1570,39	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- limites
Enjuague-Clorhexidina	*	94,238	54,1941
Enjuague -Control	*	-804,118	54,1941
Clorhexidina-Control	*	-898,356	54,1941

7. DISCUSIÓN

Al realizar este estudio se encontraron algunas limitantes éticas que impidieron el uso de una metodología que expusiera toda la cavidad oral al enjuague, además no permitió la evaluación de otros factores importantes como la dieta, la experiencia de caries, el pH, que pueden interferir con la dinámica de los depósitos microbianos, sin embargo usando métodos indirectos (placas con bloques de esmalte) , se logró obtener la cantidad suficiente de placa no disturbada, que al llevarla a un medio selectivo como el TSY20B Trypticasa soya Merck,Darmstadt, Alemania - extracto de levadura OxoidLtda,,Basingstoke, Inglaterra – Sacarosa, Merck,Darmstadt, Alemania– Bacitracina) mostró un crecimiento selectivo de *Streptococcus Mutans* como lo evidenciaron Aklwany Rosalba Medina⁶⁷.

Uno de los retos de la odontología actual es el descubrimiento o síntesis de sustancias capaces de inhibir o disminuir la aparición, de bacterias patógenas con influencia negativa en los tejidos de la cavidad bucal es por eso que la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana es un desafío continuo y las plantas medicinales se han considerado como una opción interesante debido a su uso en la medicina popular para el tratamiento de varias enfermedades infecciosas.

En el presente estudio se encontró que la clorhexidina (control positivo) fue más efectivo al compararlo con la mezcla ideal y el control en la reducción de las UFC sobre *Streptococcus Mutans* , similares resultados fueron ratificados por Naiana B, Da Silva en el año 2012, al considerar el antiséptico de clorhexidina como medida segura y eficaz para la reducción de placa bacteriana por la disminución de los niveles de *Streptococcus mutans* . en donde, demostró que las especies bacterianas eran resistentes a los aceites esenciales, tinturas, citratos

⁶⁷ MEDINA Rosalba y cols. Op. Cit., p.1-120. ISSN: 1794-2470.

Cymbopogon, *Plectrantusamboinicus* y *Conyzabonariensis* pero fueron susceptibles a 0,12% de clorhexidina es decir , que los aceites esenciales estudiados no mostraron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos del biofilm dental⁶⁸ , así mismo Elizabeth N Southern en el 2006 comparó el efecto de la clorhexidina con enjuagues a base de plantas encontrando mejores resultados en la clorhexidina⁶⁹ , esto debido a su molécula bicationica según lo afirmó SetuMathur 2011⁷⁰; es por eso que sigue siendo el mejor agente antimicrobiano para prevenir las enfermedades orales, especialmente enfermedades relacionadas con la placa tales como la caries dental. Así lo refiere Cavalcante B. Maria 2012⁷¹ y Filoche SK 2005⁷² quienes afirman que la clorhexidina es el antibacterial ampliamente considerado como el agente más eficaz contra la placa dental y gingivitis. Por lo tanto, todos los "nuevos" productos antibacterianos se han comparado con el "estándar de oro" clorhexidina, por su efecto sobre los microorganismos orales.

Otros autores confirman que la clorhexidina es uno de los compuestos más probados y sus propiedades anti-placa son bien conocidas, En un modelo de biopelícula supragingival, la clorhexidina ha demostrado inhibir el crecimiento de bacterias y la formación de biofilm Fu Chen and Dong Wang 2010⁷³.

En contraste con los resultados encontrados en esta investigación en donde hubo diferencias significativas al comparar la disminución de las UFC por la clorhexidina la cual fue mayor a la lograda por la mezcla ideal, Marco Antonio Botelho en el 2008 en Brasil encontró que al contar Los *Streptococcus mutans* en el grupo Azadirachta se redujo de una media de 9550 UFC / ml a 1200 UFC / ml (P

⁶⁸ DA SILVA N y cols. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. En:ContempClin Dent. 2012 Jul-Sep, vol.3, N°3, p. 302–305

⁶⁹ SOUTHERN E, MCCOMBS G, TOLLE S Lynn, MARINAK Ken. Op. cit.

⁷⁰ MATHUR Setu y cols. Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. En:Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology.2011, vol. 1, p. 45– 50

⁷¹CAVALCANTE BORGES F Y Cols. Antimicrobial effect of chlorhexidinedigluconate in dentin: In vitro and in situ study. En: Conserv Dent. 2012, vol.15, N°1, p.22–26.

⁷² FILOCHE SK , SOMA K, SISSONS CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidinedigluconate. En:Oral Microbiology Immunology. 2005, vol.20, p. 221–225

⁷³ FU CHEN ,DONGWANG.Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. En: ExpertOpinTher Pat. Center, Omaha. 2010 Mayo, vol. 20, N°5, p. 681–694

<0,001). Los resultados en la mediana del grupo de control UFC fueron de 3800 a 900 (P <0,001). Por lo tanto no hubo diferencias estadísticamente significativas cuando los resultados microbiológicos se compararon entre los grupos (P = 0.7) este mismo autor en el 2007 demostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa (p> 0,05) entre *Lippia sidoides* y clorhexidina para cualquiera de los parámetros clínicos evaluados a lo largo del estudio⁷⁴.

En la presente investigación mostró una disminución de las UFC al utilizar la mezcla ideal (enjuague aceites esenciales), de igual forma otros autores afirman que los productos naturales son prometedores agentes para prevenir las enfermedades orales, especialmente enfermedades relacionadas con la placa tales como la caries dental. Así lo refieren T Nalina y ZHA Rahim 2007⁷⁵, ŞūraBaykanErel 2012⁷⁶ y UB,Owhe-Ureghe 2010⁷⁷ donde reconocen que diversos compuestos naturales han evidenciado actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*.

En este orden de ideas esta investigación acogió la sustancia ideal (albahaca, clavo de olor y mandarina) por ser la que al final tuvo un mejor efecto marcado de la MIC₅₀ in vitro. Este resultado es consistente con el reportado por AHONKHAI I, AYINDE BA 2009, quien encontró que los aceites volátiles de *O,gratissimum* y *O,bacilicum*, crearon un efecto inhibitorio contra la flora microbiana oral⁷⁸, D,Runyoro 2010 demostró que los aceites esenciales de las cuatro especies estudiadas *Ocimum* podrían ser utilizado como potenciales agentes

⁷⁴ BOTELHO Marco Antonio y cols. Efficacy of a mouthrinse based on leaves of the neemtree (Azadirachtaindica) in the treatment of patients with chronic gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. En: Journal of Medicinal Plants Research. November, 2008, vol. 2, N°11, p. 341-346

⁷⁵T NALINA Z.H.A. RAHIN, American Journal of Biotechnology and Biochemistry The crude aqueous extract of piper betle l. and its antibacterial effect towards streptococcus mutans .3(1):10-15 ,2007

⁷⁶BAYKAN EREL Ş, REZNICEK G, ŞENOL S, KARABAY YAVAŞOĞULU N, KONYALIOĞLU S. Antimicrobial and antioxidant properties of Artemisia L. species from western Anatolia. En: Turk J Biol. 2012, vol.36, p. 75-84.

⁷⁷OWHE-UREGHE B, EHWARIEME D. A, EBOH D. O. Antibacterial activity of garlic and lime on isolates of extracted carious teeth. En: African Journal of Biotechnology. 24 May 2010, vol. 9, N°21, p. 3163-3166.

⁷⁸AHONKHAI I, AYINDE BA, EDOGUN O, UHUWMANGHO MU. Antimicrobial activities of the volatile oilsofocimumbacilicum l.And ocimumgratissimum l. (lamiaceae) against some aerobic dental isolates. En: J. Pharm. Sci. October 2009, vol. 22, No.4, p.405-409.

antimicrobianos⁷⁹ . De igual forma estudios conducidos por Betoni y cols. 2006 en Brasil demostraron que el clavo de olor tiene propiedad antimicrobiana⁸⁰ .

En el presente estudio se destacó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la albahaca y clavo de olor, conocidos por su actividad antiséptica, así lo reportó Moon⁸¹ quien evaluó la actividad antimicrobiana de AE de *Eugenia caryophyllata Thunberg* pero confirmando los efectos sobre bacterias cariogénicas. Son muchos los investigadores que confirman la actividad antimicrobiana del clavo de olor como Kaoutar Bayoub 2010⁸² , B C Nzeako⁸³ , Eugenia pinto en 2009⁸⁴ y RosinaKhan 2009⁸⁵ . Por otra parte Matiz y cols. Describió la actividad antimicrobiana de los aceites volátiles de mandarina (*Citrus reticulata*) contra bacterias gran positivas y negativas⁸⁶ .

En esta investigación se estudió el efecto sinérgico de los aceites esenciales los cuales mostraron resultados prometedores en contra del *Streptococcus mutans* , autores como U.B, Owhe-Ureghe 2010⁸⁷ y Sang-Eun Moon en el 2011⁸⁸ , también demostraron el efecto sinérgico de aceites esenciales en cuanto a su actividad antimicrobiana. Esto puede ser atribuido según lo refieren HJD,Dorman and SG,Deans 2000 y Cristiane de Bona da Silva en el 2008 a la composición, la configuración estructural de los componentes constituyentes de los aceites vegetales volátiles, sus grupos funcionales y las posibles interacciones sinérgicas

⁷⁹ D. RUNYORO A, O. NGASSAPA A, K. VAGIONAS B. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. En: Food Chemistry. 2010, vol.119, p. 311–316.

⁸⁰ BETONI Joyce Elaine, PASSARELLI MANTOVANI Rebeca. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, June 2006 Vol. 101(4): 387-390.

⁸¹ SANG-EUN MOON A, HYE-YOUNG K, JEONG-DAN C. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. En: ORAL BIOLOGY. September 2011, vol. 56, p. 907–916.

⁸² KAOUTAR B, TARIK B, DRISS M, ABDELAZIZ R, ABDELAZIZ S. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. En: African Journal of Biotechnology. 5 July 2010, vol. 9, Nº27, p. 4251-4258.

⁸³ NZEAKO B C y cols. Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts. En: sultan qaboos university medical journal. June 2006, vol. 6, Nº 1, p. 33-38.

⁸⁴ 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: Journal of Medical Microbiology. 2009, vo. 58, p. 1454–1462

⁸⁵ KHAN Rosina y cols. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. En: journal/molecules. 2009, vol. 14, p. 586-597.

⁸⁶ MATIZ G, CARMONA L. Op. Cit.

⁸⁷ OWHE-UREGHE B, EHWARIEME D. A, EBOH D. O. Op. cit., p. 3163-3166.

⁸⁸ SANG-EUN MOON A, HYE-YOUNG K, JEONG-DAN C. Op. cit., p. 907–916.

entre los componentes ⁸⁹ . A diferencia de los autores mencionados anteriormente, Neeti Bajaj and Shobha Tandon en el año 2012 no encontraron datos estadísticamente significativos cuando se comparan los aceites esenciales con la clorhexidina ⁹⁰ . Se puede decir que los aceites esenciales al igual que la clorhexidina muestran actividad antimicrobiana así lo referencia Pauline C. Pana, Scott Harp 2010 quienes *in vitro* demostraron que enjuagues con EO y CHX presentaron actividad antimicrobiana ⁹¹ y WH. Himratul Aznita 2009 ⁹² , encontró que con la clorhexidina (CHX), hexetidina (Hx) y Eugenia caryophyllus (clavo) Extracto (CE) puede reducirse significativamente la población de la placa dental.

Por ultimo partiendo en que la OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales y recomienda que sean establecidos métodos y criterios científicos para asegurar la calidad de las preparaciones obtenidas con plantas medicinales, así como su efectividad en el tratamiento de condiciones y enfermedades específicas por distintos profesionales de la salud y el establecimiento de centros de investigaciones y capacitaciones de plantas medicinales (Alvarado ,et al, 2008) ⁹³ .

⁸⁹ DORMAN H.J.D, DEANS S.G. Op. cit., p. 308–316

⁹⁰ NEETIBAJAJ Y SHOBHA TANDON. El efecto de Triphala y clorhexidina enjuague bucal sobre la placa dental, inflamación gingival, y el crecimiento microbiano. En: Int J Ayurveda Res. 2011 Ene-Mar, vol. 2, N°1, p. 29-36.

⁹¹ PANA P, HARPERA S, RICCI-NITTELA D, LUXB R, SHIB,C. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. En: J Dent. 2010 June, vol. 38, p. 1- 10.

⁹² HIMRATUL AZNITA W H, ZAINAL-ABIDIN Z, AZNAN E, RAZI M.N. Op. cit., p. 716-719.

⁹³ ALVARADO, A., TELLEZ, N. Y GAMBOA, F. Evaluación de la actividad inhibitoria de extractos, fracciones y subfracciones obtenidas de plantas isertialeavis sobre bacterias de importancia en la caries dental. Revista de la Federacion Odontologica Colombiana. Volumen 71, numero 223:8-15.

8. CONCLUSIÓN

A pesar de los limitantes encontrados en la realización del presente estudio, podemos concluir que el objetivo propuesto en determinar la efectividad de una mezcla ideal compuesta por aceites esenciales sobre los *Streptococcus mutans* se ha logrado debido a que estos aunque difieren significativamente en la efectividad antimicrobiana con respecto a la clorhexidina, se pueden considerar como alternativas válidas al momento de elegir un enjuague bucal, puesto que al compararlo con un grupo control negativo producen efectos de inhibición sobre las colonias de *Streptococcus Mutans*, de manera significativa.

Aunque en el presente estudio se demostró que la clorhexidina tiene mayor potencial antimicrobiana, la literatura nos muestra que su uso prolongado puede ocasionar efectos adversos tales como la aparición de manchas en los dientes amarillo o marrón y en las mucosas, lesiones eritematosas descamativas, alteración del gusto, inflamación reversible de la glándula parótida y resistencia reversible a las drogas, es por esto que se hace necesario poder sugerir el uso de estos productos vegetales, además buscar más alternativas, ya que según antecedentes históricos tienen respuestas antimicrobianas y ofrecen efectividad tal como los antisépticos comerciales actuales.

Este estudio ha permitido vislumbrar las bondades del clavo de olor, albahaca y mandarina y en conjunto con los resultados de esta investigación válida y confiable, son bastante sugerentes para proponer el planteamiento de otros esfuerzos que cimienten y promuevan una tecnología tan simple, elemental y de costo extremadamente mínimo, como lo es el uso de una infusión mediante enjuagatorio para controlar y prevenir las nosologías bucales de origen bacteriano. Dada la escasez de investigaciones científicas en el área temática, fortalece el valor del trabajo propuesto. De esta manera, la presente investigación podrá

brindar una alternativa de elección en la inhibición de placa dentobacteriana y por consiguiente una alternativa en la prevención y tratamiento de las patologías más frecuentes de la cavidad bucal.

Como beneficio de esta investigación se quiere un cambio de mentalidad para nuestra práctica profesional y proporcionar una atención odontológica que deje de ser restauradora y mutiladora, con un manejo del método científico en la búsqueda de nuevos conocimientos de acuerdo a nuestra realidad social.

9. RECOMENDACIONES

En concordancia con estos resultados es pertinente recomendar la profundización de este tipo de investigaciones en Colombia y porque no en la facultad de odontología de la universidad de Cartagena, por ser nuestro país uno de los principales países rica en flora en Latinoamérica, en aras de desarrollar nuevas líneas de investigación, diversos productos y servicios terapéuticos que ofrezcan significativos beneficios para los pacientes odontológicos.

Además, es importante destacar que es necesaria la realización de una futura investigación que involucre un mayor número de individuos, de modo de poder validar los hallazgos observados. Así como también realizar una encuesta para medir el grado de aceptación del producto como lo hizo Groppo FC en su estudio actividad antimicrobial del ajo, te y clorhexidina contra microorganismos .

Realizar otra prueba de citotoxicidad a los aceites esenciales estudiados para corroborar su biocompatibilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. AHONKHAI I, AYINDE BA, EDOGUN O, UHUWMANGHO MU, Antimicrobial activities of the volatile oils *Socimumbacilicum* I, And *occimumgratissimum* I, (lamiaceae) against some aerobic dental isolates, En: J, Pharm, Sci, October 2009, vol, 22, No, 4, p, 405-409,
2. ALONSO, J, Tratado de Fitofármacos y nutracéuticos, En: Rosario: Editorial Hábeas, 2004, p, 120-124,
3. ANDREWS, J, M, Determination of minimum inhibitory concentrations, En: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, vol, 48, p, 5-16,
4. BAYKAN EREL Ş, REZNICEK G, ŞENOL S, KARABAY YAVAŞOĞULU N, KONYALIOĞLU S, Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L, species from western Anatolia, En: Turk J Biol, 2012, vol, 36, p, 75-84,
5. BECKER MR, PASTER BJ, LEYS EL, MOESCHBERGER , KENYON SG, GALVIN JL, BOCHES SK, DEWHIRST FE, GRIFFEN AL, Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries, En: J Clin Microbial, 2002, vol, 40, N°3, p, 1001-1009,
6. BETONI Joyce Elaine, PASSARELLI MANTOVANI Rebeca. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, June 2006 Vol. 101(4): 387-390.
7. BOTELHO Marco Antonio y cols, 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, November, 2008, vol, 2, N°11, p, 341-346,

8. BOTELHO Marco Antonio y cols, Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: a doubleblinded randomized controlled trial, En: J Appl Oral Sci, 2007, vol, 15, N°3, p175-80,

9. CALVO M,A, ANGULO E, COST-BATLLI , SHIVA P, ADENLANTADOC, VICENTE A, Natural plant Extract and Organic Acids: Synergism and implication an piglets intestinal macrobiotic biotechnology, 2006, vol, 5, N°2, P, 137-142

10. CAVALCANTE BORGES F Y Cols, Antimicrobial effect of chlorhexidinedigluconate in dentin: In vitro and in situ study, En: Conserve Dent, 2012, vol, 15, N°1, p, 22–26,

11. CAPPASO L,A, 5300 years ago The Ice Man Use Natural Laxative and Antibiotics, En: lancet, 1998, vol, 352, N°5, p, 1864

12. CARCAMO, O, V,; OLIVA, M, P, & GONZLEZ, C, P, Efectividad antimicrobiana del colutorio de Matricaria recutita, en funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo, Chile, En: Int, J, Odontostomat, 2011, vol, 5, N°2, p, 179-184,

13. CIANCIOS, Use of mouthrinses for professional indications, En: Journal Of Clinical Management Periodontology, 1988, vol, 21, p, 59-78,

14. DA SILVA N y cols, In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria, En: Contemp Clin Dent, 2012 Jul-Sep, vol, 3, N°3, p, 302–305

15. DE BONA DA SILVA C, GUTERRES S, WEISHEIMERI V, ELFRIDES E, Schapovall S, Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against Candida spp, En: Braz J Infect Dis, Salvador Feb 2008, vol, 12, N°1, p: 63-65.

16. DEPAOLA LG, OVERHOLSER CD, MEILLER TF, Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development, En: J, Clin Periodontol, 1989, vol, 16, p, 311-315.
17. DORMAN H, J, D, DEANS S, G, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, En: Journal of Applied Microbiology, 2000, vol, 88, p, 308–316.
18. D, RUNYORO A, O, NGASSAPA A, K, VAGIONAS B, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four Ocimum species growing in Tanzania, En: Food Chemistry, 2010, vol, 119, p, 311–316.
19. EGUIZÁBAL Marly A, MORONI NAKATA Hilda, Actividad Antimicrobiana in vitro del extracto etanolico de propoleo peruano sobre el Streptococcus Mutans y Lactobacillus Casei, En: Odont San Marquina, 2007, p, 18-20.
20. EKSTRAND KR, RICKETS DNJ, Kidd EAM, Occlusal Caries, En: Pathology, Diagnosis and Logical Management, Dent Update, 2001, vol, 28, p, 380 – 7.
21. FANI MM, KOHANTEB J, DAYAGHI M, Inhibitory activity of garlic (Allium sativum) extract on multidrug-resistant Streptococcus mutans, En: Official publication of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry, 2007, vol, 25, N.º 4, p, 164-168.
22. FEJERSKOV O, KLARSON BH, Dynamics of caries lesion formation, En: Fluoride in Dentistry, Munksgaard, Copenague, Dinamarca 1996, Cap, 11, p, 187-213.
23. FILOCHE SK, SOMA K, SISSONS CH, Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidinedigluconate, En:. Oral Microbiology Immunology, 2005, vol, 20, p, 221–225.

24. FU CHEN,DONGWANG,Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey,En: Expert Opin Ther Pat, Center, Omaha, 2010 Mayo,vol, 20, N°5, p, 681–694.
25. F BERNARDI MR, PINCELLI S, CARLONI MR, GATTO L,MONTEBUGNOLI,Chlorhexidine with an Anti Discoloration System, A comparative study,En: Int J Dent Hygiene, 2004, vol,2, p, 122–126.
26. GAMBOA F; ESTUPIÑAN M; GALINDO A, Presence of Streptococcus mutans in saliva and its relationship with dental caries: antimicrobial susceptibility of the isolates,Universities Scientiarum,En: revista de la facultad de ciencias Pontificia Universidad Javeriana,vol, 9, p, 23-27.
27. GARY M, WHITFORD L, WASDIN T, SCHAFFER M,Plaque Fluoride Concentrations Are Dependent on Plaque Calcium Concentrations,En: Caries Res, 2002,vol, 36, N° 256, p, 265.
28. GERARD J, TORTORA Berdell R, FUNKE Christine L, Case Microbiologia,9° edición Panamericana,2007, p,178-179.
29. GUILARTE, C, y PERRONE,M,Microorganismos de la placa dental relacionados con La Etiología de la Periodontitis,En: Acta odontol,Venez, 2004,vol, 42, N° 3, p, 213-217, ISSN 0001-6365.
30. GOLDMAN P,Herbal Medicine Today and Root of modern pharmacology,En: Ann Intern Med,2001, vol,16135,N°.18, p, 594-00.
31. GONZÁLEZ F, ALFARO L, NIETO C, CARMONA L, Evaluación de las condiciones de salud oral y los conocimientos en niños escolarizados entre 5 y 14 años de la población de Boquilla Cartagena de indias2005,En: revistacientífica Uni Bosque odontología, 2006, vol,12, N° .1, p, 25-34.

32. GOULD G,W,IndustryPerspectives on the use of natural antimicrobial and inhibitors for food applications,En: J,FoddProl (supl),1996, p, 82-86.
33. HALBERSTEIN,R,A,Medicinal Plants: Historical and cross –cultural usage patterns,En: Ann,Epidemiol,2005, vol,15, N° 9, p,686-99.
34. HIMRATUL AZNITA W H, ZAINAL-ABIDIN Z, AZNAN E, RAZI M,N, The Effectiveness of Chlorhexidine,Hexetidineandcaryophyllus Extracts in Commercialized Oral Rinses to reduce Dental Plaque Microbes,En: Research journal of biological sciences, 2009, vol,4, N°6, p, 716-719,
35. JOYCE E, BETONI C, PASSARELLI R, NUNES L,DI STASI L C, FERNANDES JUNIOR A, Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on Staphylococcus aureusdiseases,En: MemInstOswaldo Cruz, Rio de Janeiro, June 2006,vol, 101, N°. 4, p, 387-390.
36. KAOUTAR B, TARIK B, DRISS M, ABDELAZIZ R, ABDELAZIZ S,Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains,En: African Journal of Biotechnology, 5 July 2010,vol, 9, N°27, p, 4251-4258.
37. KHAN Rosina y cols, Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin,En: journal/molecules, 2009,vol, 14, p, 586-597.
38. KLEINBERG I, A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans*and specific-plaque hypothesis,En: Crit Rev Oral Biol Med,2002,vol, 13, p, 108-125.

39. KOLENBRANDER P, PHUCAS C, Effect of saliva on coaggregation of Actinomyces and Streptococcus species,En: InfectImm, 1984,vol, 44, p, 228 – 233.
40. K,R,EKSTRANDM,E,C,Christiansen Outcomes of a Non-Operative Caries Treatment Programme for Children and Adolescents, Department of Cariology and Endodontic, Dental Faculty, University of Copenhagen, Copenhagen and Public Dental Health Service, Municipality of Nexö,Nexö, Denmark ,En: Caries Research,2005, vol,39, p, 455–467.
41. LC,EGUIZÁBAL A, MOROMINAKATA H, In vitro antibacterial activity of Peruvian propolis' ethanolic extracts on Streptococcus mutans and Lactobacillus,En: Odontol,Sanmarquina, 2007, vol,10, N° 2, p, 18-20.
42. MANOSROI J, SAINAKHAM M, MANOSROI W, MANOSROI A, Anti-proliferative and apoptosis induction activities of extracts from Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database,En: Journal of Ethnopharmacology, 2012, vol,141, N°1, p,451-459.
43. MARTÍNEZ J,, SULBARÁN DE FERRER B,, OJEDA DE RODRÍGUEZ G,,FERRER A, NAVA R,Antibacterial activity of mandarin essential oil,En: Rev,Fac,Agron,oct, 2003, vol,20,Nº.4, p, 1-12.
44. MARSH P,D, Contemporary perspective on plaque control,En: British Dental Journal, 2012,vol, 212, p, 601-606.
45. MATHUR Setu y cols,Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control,En:Journal of Physiology, Pharmacy& Pharmacology,2011,vol, 1, p, 45– 50.

46. MATIZ G, CARMONA L, Evaluación de actividad antimicrobiana de mezclas de aceites esenciales sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, bacteria implicada en la producción de caries, Cartagena 2011.
47. MEDINA Rosalba y cols, Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro", En: nova - publicación científica, junio de 2005, vol,3, no, 3 enero, p,1-120,issn: 1794-2470.
48. MINAH GE, DEPAOLA LG, OVERHOLSER CD, Effects of 6 months use an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora, En: J Clin Periodontol, 1989, vol,16, p, 347-352.
49. MINISTERIO DE SALUD COLOMBIA ,Estudio Nacional de Salud Bucal, Serie Documentos Técnicos, tomo VII, Bogota,1999.
50. MOROMI NAKATI Hilda, Efecto del Té verde en la formación de la placa bacteriana por el *Streptococcus Mutans*, EN: Odontol, Sanmarquina, 2006 9(2)
51. MOROMI NAKATA H, MARTÍNEZ E, In vivo antimicrobial effect of *Camellia sinensis* on oral bacteria, En: Odontol, Sanmarquina, 2007, vol, 10, N° 2, p, 12-14.
52. NEETIBAJAJ Y SHOBHA TANDON, El efecto de Triphala y clorhexidina enjuague bucal sobre la placa dental, inflamación gingival, y el crecimiento microbiano, En: Int J Ayurveda Res, 2011 Ene-Mar, vol, 2, N°1, p, 29-36.
53. NZEAKO B C y cols, Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts, En: sultan qaboos university medical journal, June 2006, vol, 6, N° 1, p, 33-38.
54. OKADA M, SODA Y, HAYASHI F, DOI T, SUZUKI J, MIURA K, KOSAI K, PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from pre-school children, En: J Med Microbiol, 2002, vol, 51, p, 443-447

55. OVERHOLSER C, Comparative effects of 2 chemotherapeutics mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis,En: J Clin Periodontol,1990, vol,17, p, 575-579.
56. OWHE-UREGHE B, EHWARIEME D, A, EBOH D, O, Antibacterial activity of garlic and lime on isolates of extracted carious teeth,En: African Journal of Biotechnology, 24 May 2010,vol, 9, N°21, p, 3163-3166.
57. OWHE-UREGHE B, EHWARIEME D, A, EBOH D,O,Op,cit,, p,3163-3166.
58. PALOMBO Enzo A, traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases,En: evidence-based complementary and alternative medicine, 2011, vol,1, p,15,
59. PALOMBO Enzo A, Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases,En: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, p,1-15.
60. PANA P, HARPERA S, RICCI-NITTELA D, LUXB R, SHIB,C, In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses,En: J Dent, 2010 June,vol, 38, p, 1- 10.
61. PINTO E, VALE-SILVA L, CAVALEIRO C, SALGUEIRO L, Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida,Aspergillus and dermatophytes species,En: Journal of Medical Microbiology, 2009,vo, 58, p,1454–1462.
62. POPPEENGA R,H, Risk associated with the use of herbs and other dietary supplements veterinary,En: Clin North Am Equine practice, 2001,vol, 17, N°.3, p,455-77.

63. RIBEIRO Cecilia, TABCHOURY C., DEL BELCURY A., TENUTA L, ROSALENAND P, CURY J, Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose,En: British Journal of Nutrition, 2005,vol, 94, p, 44–50.
64. SANG-EUNMOONA, HYE-YOUNG K, JEONG-DAN C, Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria,En: ORAL BIOLOGY, September 2011,vol, 56,p, 907–916.
65. SANTOS A, Evidence-based control of plaque and gingivitis,En: J,ClinPeriodontol,2003,vol, 30, p, 13-16.
66. SALAZAR L; MEDINA F; DONOSO F; BARRIENTOS L; SANHUEZA A,ActionIn vitro Antimicrobial Activity of Honey on mutans Streptococci,En: International Journal of Morphology *version On-line*,2009,vol, 27, p,77-82.
67. SHIVA C,M Y CALVO M,A, Aspectos sobre la capacidad antibacteriana de extractos naturales y acidorganicos,En: Anales de la Real academia de doctores de España,2003,vol, 7, p, 121-129.
68. SMULLEN G,A, KOUTSOU H,A, FOSTER A,ZUMBE,Actividad antibacteriana de los extractos vegetales que contienen polifenoles contra el StreptococcusMutans,En: BiomedicalSciencieResearch Manchester, 2007.
69. SOUTHERN E, MCCOMBS G, TOLLE S Lynn, MARINAK Ken,The Comparative Effects of 0,12% Chlorhexidine and Herbal Oral Rinse on Dental Plaque-Induced Gingivitis,En:Journal of Dental Hygiene, January 2006,vol, 80, No.1,p 1-8.
70. SRIKANTH RK, SHASHIKIRAN ND, SUBBA REDDY VV, Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children,En: J Indian SocPedodPrev Dent, Jun 2008,vol, 26, N° 2, p, 67-70.

71. STRAETEMANS MM,VAN LOVEREN C, DE SOET JJ, DE GRAAFF JJ, TENCATE JM,Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five,En: J Dent Res, 1998,vol, 77, p,1851-5.
72. TANZER JM, LIVINGSTON J, THOMPSON AM, The microbiology of primary dental caries in humans,En:JDentEduc,2001,vol, 65, p,1028-37.
73. T NALINA Z,H,A, RAHIN, The crude aqueous extract of piper betle l, And its antibacterial effect towards streptococcus mutans,En: American journal of biotechnonology and biochemistry, 2007, vol,3, N^o1, p,10-15.
74. TOIT,E,A Y RAUTENBACH,M, A, Sensitive Standardized Micro gel well Diffusion, Assay for the Determinationo Antimicrobial Activity ,En: J,Microbiol,Methods, 2000,vol, 42, p,159-65.
75. TONG H, GAO X, DONG X,*Streptococcusoligofermentans*ssp,nov, a novel oral isolate from caries-free humans,En: Int J SystEvolMicrobiol, 2003,vol, 53, p, 1101-1104 .
76. VAN HOUTE J, Role of Micro-organisms in Caries Etiology,En: J Dent Res, 1994,vol, 73, N^o3, p, 672-681.
77. YATSUDA R, ROSALEN P,L, CURY J,A,, R,M, MURATA, REHDEV,L,G, R, MELO L,V,, H,KOO, Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci - Journal of Ethnopharmacology,2005,vol, 97, p, 183-189.

ANEXOS

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO MENORES DE EDAD

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

TÍTULO DEL PROYECTO:EFECTOS DE UN ENJUAGUE BUCAL A BASE DE TRES ACEITES ESENCIALES (*EUGENIA CARYOPHYLLATA THUNBERG* “CLAVO DE OLOR” *CITRUS TANGERINA* “MANDARINA” *OCIMUM BASILICUM* “ALBAHACA”) SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN LA PLACA DENTAL”
INVESTIGADORES: Luis Eduardo Carmona Arango, Liceth Jiménez Pérez, Adrian Correa Turizo

FECHA: _____

Su representado menor de edad está siendo invitado a participar en el proyecto de investigación titulado: EFECTOS DE UN ENJUAGUE BUCAL A BASE DE TRES ACEITES ESENCIALES (*EUGENIA CARYOPHYLLATA THUNBERG* “CLAVO DE OLOR” *CITRUS TANGERINA* “MANDARINA” *OCIMUM BASILICUM* “ALBAHACA”) SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN LA PLACA DENTAL”, Si usted decide autorizar la participación de su representado menor de edad en este estudio, debe firmar este consentimiento informado, Su firma quiere decir que se la ha explicado y ha entendido en qué consiste la participación del menor en el estudio y sus posibles riesgos, incomodidades o molestias

El objetivo de este estudio, es: Evaluar clínicamente la efectividad de un enjuague bucal a base de aceites esenciales *Eugenia caryophyllatathunberg* “clavo de olor” *Citrus tangerina* “mandarina” *Ocimum basilicum* “albahaca” sobre placa dental y microorganismos cariogénicos como el *Streptococosmutans*.

El estudio en el que su representado menor de edad está siendo invitado a participar consiste en: el uso de una placa elaborada en acrílico, la cual iría adosada al paladar del menor, por medio de unos alambres sujetos a los molares superiores, en dicha placa se colocaran dos porciones de esmalte humano de cada lado, los cuales se obtendrán de dientes humanos recién extraídos, con el fin de aplicar en ella las dos soluciones, así aplicar 1 gota de la solución experimental al lado derecho de la placa en la capa de esmalte y 1 gota de solución control al lado izquierdo de la placa en la capa de esmalte, se esperaran 0.5 minutos y luego se aplicará agua sobre la placa sin realizar barrido con la finalidad de que se impregnen las soluciones y exista un mínimo contacto con la mucosa oral, Este proceso se realizará por 8 días, luego se recolectara la placa y se hará su respectiva pruebas de laboratorio,

Usted puede decidir no autorizar la participación de su representado menor de edad en la investigación si no lo desea o retirarlo del proyecto en cualquier momento y esta decisión no perjudicará la relación de su representado con los odontólogos tratantes, Doctores _____, quien continuarán con el tratamiento pertinente, No habrá ningún costo adicional para

usted por participación del menor en el estudio.

Los datos de este estudio serán publicados, La información publicada no incluirá el nombre del menor o cualquier otra forma de identificación, De requerirse no serán utilizados sin su expresa autorización, La historia clínica del menor podrá ser consultada por el investigador para el estudio, Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio dirigiéndose a los investigadores: Luis Eduardo Carmona Arango, Tel, 3003161405, Liceth Jiménez Pérez, Tel, 3007079613 o Adrian Correa Turizo, Tel, 3003309117

Yo _____ identificado con _____ número _____
_____ declaro que:

Me han dado una copia de este consentimiento informado, Me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas sobre la investigación y estas han sido respondidas,

He entendido perfectamente cuáles son los procedimientos que le van a ser practicados a mi representado menor de edad durante la investigación y estoy de acuerdo con que mi representado se someta a ellos, Estoy de acuerdo con que mi representado participe en el estudio,

Autorizo que los resultados obtenidos del presente estudio sean publicados,

DATOS DEL PARTICIPANTE MENOR DE EDAD

Nombre: _____ Fecha de nacimiento: _____

DATOS DEL REPRESENTANTE LEGAL

Nombre _____ C,C No, _____

Teléfono: _____ Firma _____

DATOS DE LOS TESTIGOS

Nombre _____ C,C No, _____

Teléfono: _____ Firma _____

Parentesco con el paciente: _____

Nombre _____ C,C No, _____

Teléfono: _____ Firma _____

Parentesco con el paciente: _____

Anexo 2. FOTOGRAFIAS



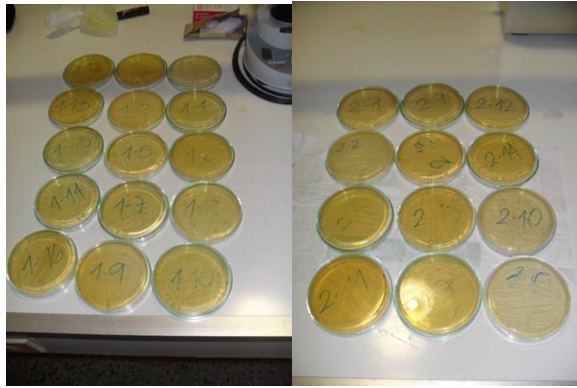
Peso del tubo eppendorf con solución salina y con placa dental en la balanza analítica



Proceso de sembrado de placa dental desde que se toma con la pipeta del tubo eppendorf hasta llevarlo en la caja de petri por agotamiento.



Las cajas de anaerobiosis con sus respectivas muestras



Conteo de colonias

Anexo 3. COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DEL ANOVA

Normalidad de los datos

La comprobación del supuesto de normalidad de los datos se hizo aplicando el test de ShapiroWilk para el grupo de datos de cada tratamiento. Encontrándose que en los tres tratamientos los datos se ajustan al modelo de distribución normal (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de rangos múltiples de los valores medios de las UFC, encontradas en cada tratamiento experimental.

Pruebas de Normalidad para sqrt(clorhexidina)

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,948194	0,5356

Pruebas de Normalidad para sqrt(Enjuague)

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,894171	0,108618

Pruebas de Normalidad para sqrt(control)

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,894171	0,108618

Verificación de la homocedasticidad

La verificación de la homocedasticidad u homogeneidad de varianzas se verifico mediante la prueba de Levene's; mediante esta se pudo comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas con p-valor igual a 0,05, entre las varianzas de los tratamientos analizados (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene's, para los valores de las UFC de cada tratamiento

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	2,71109	0,0800295

Verificación de la independencia de los residuos

La verificación de la independencia de los residuos a partir del contraste de los mismo vs análisis la posición que ocupan en las filas, permitió deducir que estos se obtuvieron de forma independiente durante el desarrollo del experimento, ya que no se observa un patrón aparente de distribución de los mismos.

