



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Búsqueda de sustancias inhibitorias de origen vegetal en contra de
Streptococcus mutans”**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Jesus Alejandro Salinas Jiménez

Directora de tesis:

D.C. Laura Abisai Pazos Rojas

Codirectora de tesis:

D.C América Paulina Rivera Urbalejo

Índice

1.- Resumen.

2.- Agradecimientos.

3.- Introducción.

3.1.- Caries dental M.O.

3.2.- Herbolaria en México contra enfermedades bucales.

3.3- *Streptococcus mutans*.

4.- Descripción de plantas.

4.1.- *Allium cepa*.

4.2.- *Chamaemelum nobile*.

4.3.- *Cinnamomum verum*.

4.4.- *Coriandrum sativum*.

4.5.- *Origanum vulgare*.

4.6.- *Salvia rosmarinus*.

4.7.- *Thuja occidentalis*.

5.- Objetivos.

5.1.- Preparación de tinturas a concentraciones estandarizadas.

5.2.- Realizar ensayos de inhibición contra *Streptococcus mutans*.

6.- Hipótesis.

7.- Metodología.

7.1.- Elaboración de extractos.

7.2.- Experimentos de inhibición.

7.2.1.- Método por halo de inhibición.

7.2.2.- Método de dilución en caldo con sembrado masivo.

7.2.3.- Determinación cuantitativa del efecto inhibitorio de extractos de plantas.

8.- Resultados.

9.- Discusión.

10.- Conclusiones.

11.- Bibliografía.

1.- Resumen.

La medicina tradicional en México es un tema de importancia nacional que actualmente está en proceso de regulación, diversas instituciones gubernamentales someten los conocimientos empíricos a pruebas de laboratorio con la finalidad de validar los tratamientos que este conocimiento ofrece. Uno de los problemas de salud que es tratado con regularidad por la medicina tradicional es la caries dental, ocasionada por diversos microorganismos entre los que destaca la bacteria *Streptococcus mutans* por su papel en la descalcificación de las piezas dentales.

Mediante las técnicas, halo de inhibición, dilución en caldo con sembrado masivo y recuento de unidades formadoras de colonia. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* en medios de cultivo BHI enriquecidos con extractos a diferentes concentraciones de *Allium cepa*, *Chamaemelum nobile*, *Cinnamomum verum*, *Coriandrum sativum*, *Origanum vulgare*, *Salvia rosmarinus* y *Thuja occidentalis*. Con los experimentos realizados se logró determinar que los extractos etanólicos de *Cinnamomum verum*, *Salvia rosmarinus* y *Thuja occidentalis* presentaron una efectiva actividad inhibitoria. Las concentraciones que se determinaron como eficientes fueron superiores al 2.25% a 9% del volumen total. Los estudios realizados permitieron determinar que las plantas *Cinnamomum verum*, *Salvia rosmarinus* y *Thuja occidentalis* poseen metabolitos o moléculas capaces de ejercer un efecto inhibitorio en contra de *S. mutans* siendo una alternativa para el tratamiento de la caries dental provocada por este microorganismo

2.- Agradecimientos.

Esta tesis es la culminación de un largo viaje escolar, que no recorrí solo, agradezco en primer lugar a mi familia, a mi madre, Estela Jiménez, quien siempre confió en mis capacidades y me vigilo desde la distancia, que se hacía corta cada vez que necesitaba su ayuda, su consejo y su cariño. A mi padre, Francisco Salinas, quien me enseñó lo que es constancia, disciplina y el valor del trabajo. A mi hermana, compañera de vida, quien también realizó todos los dibujos expuestos en este trabajo.

Agradezco a todos los maestros que siempre dieron un paso más allá de su deber y marcaron de forma positiva mi vida, atendiendo mi curiosidad por el conocimiento y dándome su consejo, gracias por su labor. Con especial mención al doctor Samuel Hernández y a la doctora Laura Pazos quienes me educaron de mayor forma, en la práctica de mi carrera.

La vida me dio un hermoso regalo al hacerme coincidir durante la licenciatura con mi novia, Karla Hernández, quien me brindó su apoyo y amor para llenarme de motivación, gracias por construir y celebrar cada paso y cada triunfo a mi lado, espero hacer lo mismo por ti y llegar juntos a la meta final/inicial, confió en ti.

Continuo con mis amigos, J. Manuel, M. Alexander, Italivi, Ángel Enrique, Marcela, Erick Saul y Pablo Antonio. Quienes se quedaron conmigo de principio a fin. Gracias por su sincera e incondicional amistad.

Finalmente, gracias a mi abuela y a todos los que me brindaron la oportunidad de abrirme camino en la vida a través de mi trabajo.

3.- Introducción.

3.1.- Caries dental

La caries dental es una enfermedad crónica, infecciosa, multifactorial y transmisible, sin distinción de edad o nivel socioeconómico, que actualmente representa un problema de salud pública a nivel mundial (1). Esta enfermedad altera la calidad de vida de las personas que la padecen, al provocar un intenso dolor en los órganos dentales, ocasionando la pérdida de estas y daño a la autoestima del afectado al provocar cambios visuales.

En un estudio comparativo entre una población rural de habitantes del estado de México y Michoacán y la población de la zona urbana en la Cd. de México, se encontró que el promedio de dientes permanentes cariados, perdidos y obturados (CPOD) cambia dependiendo de la región. Los habitantes de la zona urbana fueron los que más órganos cariosos presentaron, con un CPOD del 5.98 y del 3.57 para la zona rural, la prevalencia de la caries dental también fue mayor en los habitantes de la zona urbana, teniendo una prevalencia de 90% y 82% en la comunidad indígena (2). Estos resultados obtenidos consideraron como factores importantes en el desarrollo de la investigación la diversidad en la dieta y los cuidados dentales disponibles. Con esta investigación se recalca la importancia del cuidado de la salud dental, mayor disponibilidad e ingesta de alimentos altos en azúcares aumentan la probabilidad de desarrollar caries dentales aumenta.

Estudios como el antes mencionado, evidencian la relación de la enfermedad con el ambiente en el que se desarrolla el individuo, factores como el acceso a servicios médicos dentales, productos de higiene bucal y alimentación rica en azúcares, pueden ser factores de riesgo.

Para que esta enfermedad se desarrolle es necesario contar con un huésped susceptible, adquirir la microbiota patógena en la cavidad bucal y alimentarla con un sustrato adecuado por medio de la dieta (3). Algunas personas clasifican a la cavidad bucal como un biorreactor, puesto que cuenta con la entrada de sustrato, microorganismos presentes y la salida de productos al interior o exterior del cuerpo.

La mayoría de los microorganismos de la cavidad bucal son cocos y bacilos grampositivos o gramnegativos, aerobios, anaerobios o aerobios facultativos según su nicho ecológico (Tabla 1). Conocer la composición microbiana es importante para saber cuáles son los microorganismos asociados al desarrollo de la caries dental y como estos pueden usar los nutrientes disponibles.

Tabla 1: Distribución de bacterias en varios sitios de la cavidad bucal.(4)

Grupo Bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco
Gingival				
Cocos G+ Facultativos	28.2	44.8	46.2	28.8
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos G+ anaerobicos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos G- anaerobicos	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos G- facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos G+ facultativos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos G+ anaerobicos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos G- facultativos	NDb	3.2	2.3	1.2
Bacilos G- anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Los microorganismos de mayor interés en el estudio de caries dental pertenecen a la clase *Bacilli* (aerobios) y a la clase *Clostridia* (anaerobio) (5). Los microorganismos que con mayor frecuencia se relacionan con el inicio y desarrollo de la caries son: estreptococos del grupo *mutans*, *Lactobacillus sp.* y *Actinomyces sp.* (6)

Streptococcus mutans es beneficiado por la presencia de carbohidratos, los aprovecha en su metabolismo y sintetiza ácidos que actúan sobre el esmalte dental, subsecuentemente lo desmineraliza, con la intención de adquirir más nutrientes(7). Los minerales principalmente afectados son el calcio y fosfatos, su pérdida en el esmalte dental generan debilidad en las piezas dentales, resultando en caries o fracturas. La ausencia de *S. mutans*, los ácidos resultantes de su metabolismo y tratamientos dentales especializados en recuperar el esmalte dental dan lugar al proceso de remineralización (Figura 1).

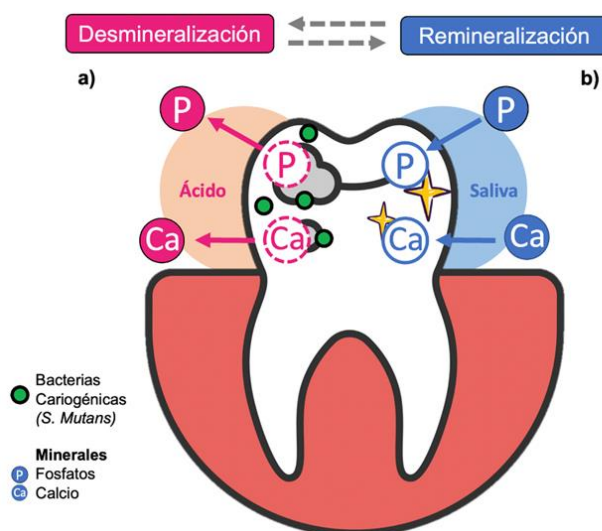


Figura 1: La caries como proceso de desmineralización y remineralización. A) desmineralización causada por la microbiota patógena en la cavidad bucal B) remineralización promovida con cuidados y tratamientos dentales (8)

Es importante acudir regularmente con el odontólogo para revisar y atender la salud bucal, así como mantener hábitos frecuentes de higiene personal para evitar la fijación de las bacterias a las piezas dentales y sus consecuencias. Actualmente se estudia la relación entre caries dental y otras enfermedades sistémicas, enfermedades cardiovasculares como obesidad y diabetes, enfermedades respiratorias como asma y fibrosis quística, enfermedades gastrointestinales y neurológicas. Todas estas complicaciones siguen en constante investigación para aclarar los mecanismos de intervención (9)

3.2.- Herbolaria contra enfermedades bucales.

Las plantas medicinales son un tema de interés para la investigación actual en el campo de la medicina, siendo cada vez más utilizadas para el tratamiento de un gran número de patologías. Muchos fármacos utilizados actualmente en la medicina alopática tienen su origen en plantas medicinales (10). Mediante el uso de enjuagues bucales a base de estas, se produce una mejora en la salud bucal, ya que muchos fitoquímicos tienen un efecto antiinflamatorio, que reduce el sangrado gingival, pero también un efecto antibacteriano esencial para mantener una salud bucal adecuada (11)

Aunque los estudios recientes se han centrado en el descubrimiento de nuevos compuestos naturales para el tratamiento de diversas patologías, aun se conoce muy poco de las plantas y los compuestos responsables del potencial terapéutico, lo que deja espacio para futuras investigaciones. Uno de los ámbitos en los que los compuestos naturales encuentran su utilidad es el tratamiento de las infecciones bacterianas, dado que la medicina moderna se enfrenta actualmente a una crisis de creciente resistencia a los antibióticos convencionales (12)

La medicina tradicional puede verse impulsada si se combina el conocimiento tradicional con el científico, investigando y validando a las plantas medicinales, las cuales son representativas de la región donde se propagan (13). Se estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional, para atender malestares catalogados como atención primaria de la salud(14), por lo cual se entiende la importancia de enfocar esfuerzos y recursos económicos en la investigación sobre su eficacia en el tratamiento de enfermedades y al mismo tiempo verificar la seguridad de sus compuestos a través de estudios toxicológicos.

Los aceites esenciales actualmente se recomiendan como reemplazo de agentes antimicrobianos y antioxidantes en productos alimenticios solos o en combinación. Estos derivados vegetales demuestran una serie de beneficios, como la capacidad de controlar el crecimiento microbiano en productos alimenticios, aumentar la vida útil de los alimentos envasados, prevenir la peroxidación lipídica y aliviar las preocupaciones de los consumidores sobre el uso de conservantes no naturales (15). Los aceites esenciales son una mezcla de componentes presentes en las plantas. Hay aproximadamente 3000 aceites esenciales identificados, de los cuales 300 son económicamente significativos, particularmente para los sectores cosmético, culinario, doméstico y farmacéutico (16). Las plantas que producen aceites esenciales pertenecen a varios géneros distribuidos en alrededor de 60 familias. Algunas familias, como *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* y *Rutaceae*, son conocidas por su capacidad para producir aceites esenciales de valor medicinal e industrial (17)

En México la medicina tradicional se encuentra en un estado de transición, lucha constantemente por integrarse al sistema nacional de salud mientras que muchos profesionales de esta área minimizan la participación de los terapeutas tradicionales (18)

Dentro de la regulación en México se presenta la ley general de la salud que en su artículo 79 expone:

“Artículo 79. - Para el ejercicio de actividades profesionales en el campo de la medicina, odontología, veterinaria, biología, bacteriología, enfermería, trabajo social, química, psicología, ingeniería sanitaria, nutrición, dietología, patología y sus ramas, y las demás que establezcan otras disposiciones legales aplicables, se requiere que los títulos profesionales o certificados de especialización hayan sido legalmente expedidos y registrados por las autoridades educativas competentes.

Para el ejercicio de actividades técnicas y auxiliares que requieran conocimientos específicos en el campo de la atención médica prehospitalaria, medicina, odontología, veterinaria, enfermería, laboratorio clínico, radiología, terapia física, terapia ocupacional, terapia del lenguaje, prótesis y órtesis, trabajo social, nutrición, patología, bioestadística, codificación clínica, bioterios, farmacia, saneamiento, histopatología y embalsamiento y sus ramas, se requiere que los diplomas correspondientes hayan sido legalmente expedidos y registrados por las autoridades educativas competentes” (19)

Esta legislación resalta que cualquier persona que desee participar en el sector salud en organizaciones como el Instituto Nacional Indigenista (INI), la Secretaría de Salud (SSA) y el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) debe contar con títulos profesionales, lo que dejó rezagado por mucho tiempo a los terapeutas tradicionales. Fue hasta 1998 cuando las instituciones de salud otorgaron capacitaciones y licencias para emplear a los terapeutas tradicionales y usar la medicina tradicional dentro de sus planes.

La medicina tradicional enfrenta múltiples problemas cuando no está respaldada por estudios científicos realizados por profesionales de la salud, como lo son: la falta de respeto hacia su origen y a las personas que la practican, pocos apoyos a su investigación y conversión a medicamentos, restricción en la práctica y abandono jurídico lo que hace que la medicina tradicional no pueda competir contra la biomedicina (18)

4.- Descripción de plantas utilizadas en este trabajo.

4.1.- *Allium cepa*.

La cebolla se ha consumido durante siglos en diversas culturas como tratamiento de múltiples dolencias, contra algunas infecciones microbianas, trastornos respiratorios, gastrointestinales, cutáneos, cardiovasculares y diabetes (20). Se ha propuesto que el origen de la cebolla se encuentra en Asia central; sin embargo, la planta se ha distribuido ampliamente en zonas templadas del hemisferio norte (21). El bulbo de la cebolla es la parte más utilizada, siendo el órgano principal de interés (Figura 2). Consiste en hojas carnosas internas rodeadas de escamas membranosas secas externas. El bulbo puede presentar varias formas, como globo, globo aplanado, fusiforme o casi cilíndrico. Las cebollas suelen existir en diferentes colores según la variedad, incluidos rojo, amarillo, blanco, verde y morado (22).

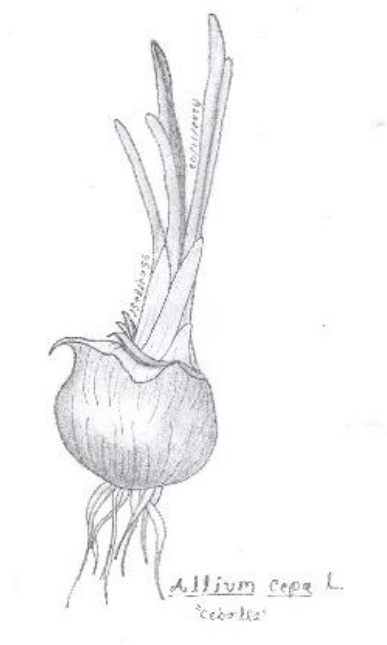


Figura 2: Bulbo de *Allium cepa*.

4.2.- *Chamaemelum nobile*.

La manzanilla es una planta anual o perenne perteneciente a la familia Astera. La manzanilla es originaria de las regiones templadas de Asia y Europa y se cultiva en todo el mundo por su alto uso en la industria cosmética, médica y alimenticia. Contiene flavonoides, cumarinas, aceites volátiles, terpenos, esteroides, ácidos orgánicos y polisacáridos. Al tener una amplia gama de compuestos, la manzanilla exhibe diversas aplicaciones médicas como anticancerígenas, antiinfecciosas, antiinflamatorias, antioxidantes, efectos hipoglucemiantes, hipotensores y antialérgicos que continúan en investigación (23).

Las raíces son delgadas, el tallo puede crecer entre 10 y 80 centímetros, las hojas son largas, estrechas y pinadas. La manzanilla posee pequeñas flores blancas con un centro amarillo (Figura 3). El uso tradicional de la manzanilla data desde la dinastía Han en el este de China, Roma, Grecia y Egipto donde comúnmente se utilizaba para tratar inflamaciones menores, dermatitis, dolores estomacales y calambres. Su uso fue ampliándose con el tiempo para tratar dolores de cabeza crónicos, diarreas, sudoración e inflamación en articulaciones. El extracto de esta planta es un ingrediente en algunos enjuagues bucales, con el fin de tratar inflamación e infecciones bacterianas (24). Actualmente la planta de manzanilla está registrada en la farmacopea de diversos países debido a sus múltiples propiedades (25).



Figura 3: Dibujo y fotografía de *Chamaemelum nobile*.

4.3.- *Cinnamomum verum*.

La canela, una especia ampliamente utilizada por sus usos medicinales y culinarios desde hace siglos. Es originaria de Sri Lanka y el sur de la India, pero también se distribuye en muchos países asiáticos, caribeños, australianos y africanos. Se utiliza ampliamente en preparaciones alimenticias y productos industriales como caramelos, chicles, enjuagues bucales y pasta de dientes. También se utiliza para tratar asma, bronquitis, diarrea, dolor de cabeza, inflamación y trastornos cardíacos. El cinamaldehído, el eugenol, el cariofileno, el acetato de cinamilo y el ácido cinámico son los principales compuestos que se encuentran en su aceite esencial. Estos compuestos exhiben una amplia gama de actividades farmacológicas como: antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, cicatrizantes, anti-VIH, ansiolíticas y antidepresivas (26).

El árbol alcanza una altura de 10 a 15 m de largo. Su fruto es una baya de un centímetro de largo que contiene una sola semilla (Figura 4). Su corteza se conoce como corteza molida y es de gran importancia económica por su uso culinario (27).



Figura 4: Dibujo y fotografía de *Cinnamomum verum*.

4.4.- *Coriandrum sativum*.

El cilantro, es una hierba aromática antigua con una historia que abarca más de 3000 años, utilizada tanto como aditivo alimentario como con fines medicinales. Si bien sus orígenes se encuentran en la región mediterránea, *C. sativum* se ha cultivado ampliamente en varias regiones de Asia, Europa y América del Norte. El aroma único de *C. sativum* se atribuye a una mezcla de compuestos volátiles liberados de sus aceites esenciales (28). Además de su valor culinario, *C. sativum* es una rica fuente de vitaminas, minerales, fibra dietética, compuestos fenólicos y otros oligoelementos esenciales, lo que lo hace benéfico para satisfacer las necesidades nutricionales.

Se utiliza en el tratamiento de enfermedades en la medicina tradicional, como agente antibacteriano, fungicida y antiespasmódico. Además, se utiliza como antidepresivo, antiestrés y analgésico para el dolor de cabeza, es un agente en el tratamiento para la anorexia, el paroxismo y el insomnio. Sus extractos poseen actividades antioxidantes y antimicrobianas debido a su composición química compuestos bioactivos como linalool, geraniol, alcanfor, acetato de geranilo y otros compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos, carbohidratos, lípidos y proteínas (29). Todas las partes de la planta *C. sativum* (figura 5) se utilizan en aplicaciones culinarias, lo que mejora aún más su valor al aportar sabor y nutrición (30).



Figura 5: Dibujo y fotografía de *Coriandrum sativum*.

4.5.- *Origanum vulgare*.

El género *Origanum* (Lamiaceae) incluye algunas hierbas anuales, perennes y arbustivas (Figura 6) conocidas con una amplia diversidad morfológica y quimio típica en todo el mundo. La mayoría de las especies del género se distribuyen en la región mediterránea, eurosiberiana e iraní-siberiana (31).

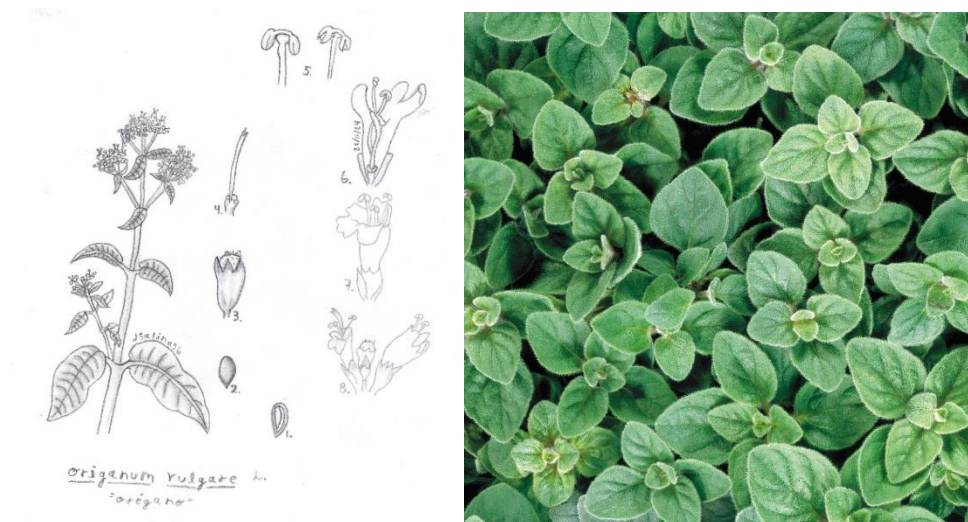


Figura 6: Dibujo y fotografía de *Origanum vulgare*.

El orégano es una planta reconocida por sus abundantes componentes bioactivos, particularmente compuestos fenólicos (32).

Las partes aéreas del orégano contienen una amplia gama de componentes químicos, incluidos fenólicos, terpenos, flavonoides, glucósidos, esteroides, taninos, resinas y mucílagos. La planta se utiliza comúnmente como hierba aromatizante en la producción e industria de alimentos y para dar sabor a ensaladas, sopas, pescado, pizza, carnes procesadas y otros alimentos. Además, el orégano, como planta medicinal, se ha utilizado tradicionalmente como expectorante, antiflatulento, aperitivo, diurético y sedante. El extracto de la planta tiene fuertes propiedades antibacterianas y antifúngicas debido a su riqueza en compuestos fenólicos. Los antioxidantes inhiben o retrasan la oxidación de las moléculas. Debido a su alto contenido fenólico, se considera uno de los antioxidantes naturales favoritos (33).

4.6.- *Salvia rosmarinus*.

El romero es un arbusto perenne aromático que crece hasta aproximadamente un metro de altura y tiene tallos erectos con hojas de color verde oscuro y flores de color azul blanquecino (Figura 8). Es originaria de la región mediterránea, sur de Europa, noroeste de España y está ampliamente distribuida por todo el mundo. Las hojas se utilizan a menudo como especias y como fuente de compuestos antioxidantes utilizados en la conservación de alimentos (34). Es una de las plantas medicinales más conocidas y valoradas, se utiliza ampliamente en productos farmacéuticos y en la medicina tradicional como diaforético, digestivo, astringente, diurético, así como para trastornos urinarios (35). Además de sus usos farmacéuticos, también se utiliza ampliamente en las industrias alimentaria, cosmética y de fragancias. Las hojas aromáticas contienen aceites esenciales con propiedades antibacterianas y se pueden utilizar como pesticida y repelente (36).



Figura 7: Dibujo y fotografía de *Salvia rosmarinus*.

4.7.- *Thuja occidentalis*.

Thuja occidentalis, la Tuya del Canadá, o Tuya occidental es una especie arbórea de la familia de las Cupresáceas. Es una conífera siempreverde originaria del nordeste de EE. UU. y sudeste de Canadá, desde el centro de Saskatchewan, este de New Brunswick, sur y este de Tennessee en las Montañas Apalache (Figura 8). Se utiliza para el tratamiento del catarro bronquial, reumatismo, psoriasis, amenorrea, cistitis, carcinomas uterinos y migraña, y como fármaco abortivo, anticonceptivo y antidiarreico en la medicina popular (37). Se ha revelado que los extractos de *T. occidentalis* poseen propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas, antiespasmódicas y gastro protectoras. Los estudios fitoquímicos han demostrado que *T. occidentalis* contiene terpenoides, esteroides, flavonoides y polisacáridos (38).



Figura 8: Dibujo y fotografía de *Thuja occidentalis*.

3.3.- *Streptococcus mutans*

El género bacteriano más representativo en la cavidad bucal es el género *Streptococcus*, teniendo presencia los grupos *salivarius*, *mutans*, *anginosus sanguinis* y *mitis* (5). Los estreptococos son descritos en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology como “Bacterias que forman células ovoides o esféricas, de menos de 2 μm de diámetro, (figura 9) grampositivas, catalasa negativa, anaerobias facultativas, con tendencia a formar cadenas o parejas (39)

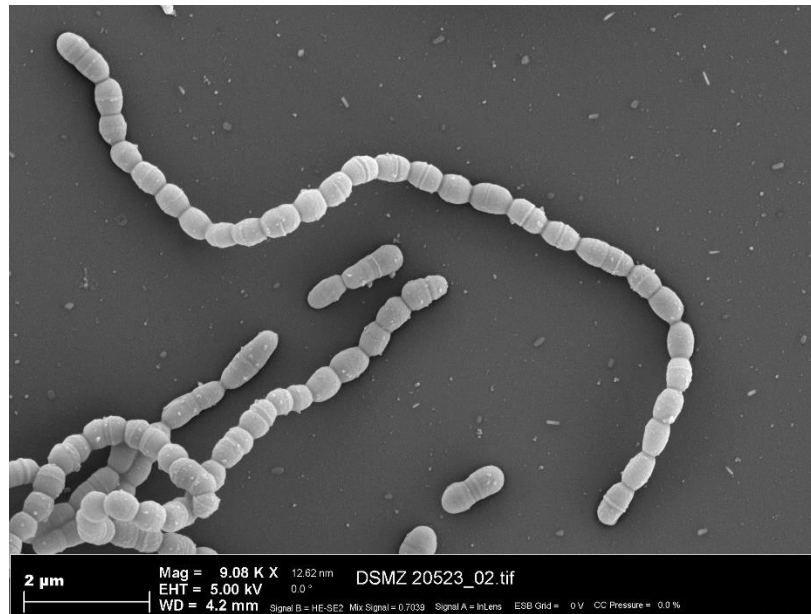


Figura 9: Micrografía de *S. mutans*. En ella se observa a *S. mutans* formar cadenas celulares con una morfología ovalada(40)

Esta especie bacteriana tiene la capacidad de fermentar la glucosa para producir ácido láctico. La mayor parte de las distintas especies del género *Streptococcus*, crecen bien en medios enriquecidos con sangre, suero o carbohidratos, a 35-37 °C, especialmente si son incubados en una atmósfera con dióxido de carbono al 5-7%. Algunas especies, incluso necesitan el CO₂ para crecer, como algunos *S. pneumoniae* y ciertos estreptococos del grupo *viridans* (41)

Para poder clasificar a las especies pertenecientes a este grupo se realizan estudios filogenéticos basados en el estudio del gen 16SrRNA (Tabla 2) debido a que es una secuencia genética altamente conservada a lo largo de la evolución (42).

Existen otras maneras de clasificar a los *Streptococcus* como lo es en función de la hemólisis, una clasificación limitada pero útil en el ámbito clínico. Lancefield en 1993 (43) realizo por primera vez la clasificación de *Streptococcus* basándose en los carbohidratos reactantes de la superficie de la pared celular, lo que se conoce como serotipos. Estos serotipos identifican muy bien a especies patógenas, sin embargo, los antígenos específicos pueden estar presentes en más de una especie.

Como resultado de ambas metodologías se generó la siguiente clasificación de *Streptococcus* basándose en la secuencia del gen 16SrRNA (Tabla 2) (44)

Tabla 2: clasificación de Streptococcus por grupos según diferencias genéticas y morfológicas.

Grupo piogénico	Grupo mitis	Grupo anginosus	Grupo salivarius	Grupo bovis	Grupo mutans	Otros estreptococos
<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. suis</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. vestibularis</i>	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. intestinales</i>
<i>S. disgalactiae</i> spp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. gallolyticus</i> spp. <i>gallolyticus</i>	<i>S. ratus</i>	<i>S. entericus</i>
<i>S. disgalactiae</i> spp. <i>equisimilis</i>	<i>S. sanguis</i>			<i>S. gallolyticus</i> spp. <i>macedonicus</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. acidominimus</i>
<i>S. canis</i>	<i>S. gordonii</i>			<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. downei</i>	<i>S. gallinaceus</i>
<i>S. equi</i> spp. <i>equi</i>	<i>S. parasanguis</i>			<i>S. lutetiensis</i>	<i>S. ferus</i>	<i>S. thoraltensis</i>
<i>S. equi</i> spp. <i>zooepidemicus</i>	<i>S. crista</i>			<i>S. infantarius</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. pluranimalium</i>
<i>S. uberis</i>	<i>S. australis</i>				<i>S. orisratti</i>	<i>S. hyovaginalis</i>
<i>S. parauberis</i>	<i>S. infantis</i>					<i>S. ovis</i>
<i>S. hyointestinalis</i>	<i>S. peroris</i>					
<i>S. iniae</i>	<i>S. sinensis</i>					
<i>S. didelphis</i>						
<i>S. phocae</i>						
<i>S. porcinus</i>						
<i>S. urinalis</i>						

El grupo *mutans* fue descrito por Clarke en 1924 a partir de la biopelícula presente en dientes planteando una relación directa con el consumo de glucosa en la dieta (45). *Streptococcus mutans* está altamente relacionado con la caries dental, dentro de este grupo se encuentran alrededor de 8 especies, que colonizan diferentes partes de la cavidad oral de humanos y animales. Para identificar a este género se pueden aplicar distintas pruebas bioquímicas, (Tabla 3) aunque para una correcta identificación de este género será necesario realizar técnicas de biología molecular (46)

Tabla 3: Pruebas bioquímicas aplicadas a Streptococcus mutans

Prueba bioquímica	Resultado esperado
Voges-Proskauer	Positiva (color rojo en el medio)
Fermentación de manitol	Positiva (cambio del color del medio de rojo a amarillo)
Fermentación de sorbitol	Positiva (colonias rosadas-rojizas)
Descarboxilación de L-arginina.	Negativo (coloración amarilla en el medio.)

La formación de una biopelícula dental y su sistema de quórum sensing son fundamentales en la vida bacteriana de *S. mutans*, este proceso favorece momentos clave como la capacidad de sintetizar glucanos, fijar compuestos a la película dental y producir ácido láctico. La supervivencia, persistencia y desarrollo de *S. mutans* depende de su crecimiento en biopelícula, donde se protege del oxígeno, agentes tóxicos, maximiza su biomasa y ocurre intercambio genético (47). La generación de caries es provocada por el metabolismo de *S. mutans*, usando carbohidratos para producir ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven los minerales del esmalte, generando calcio y fosfato. El calcio y fosfato se difunden fuera del esmalte y son aprovechados por más bacterias presentes en la biopelícula, generando la desmineralización (48)

5.- Objetivo general.

Realizar una búsqueda de sustancias de origen vegetal con efecto inhibitorio en contra de *S. mutans*.

Objetivos particulares.

1. Preparar extractos etanólicos de las plantas *Allium cepa*, *Chamaemelum nobile*, *Cinnamomum verum*, *Coriandrum sativum*, *Origanum vulgare*, *Salvia rosmarinus* y *Thuja occidentalis* a concentraciones estandarizadas.
2. Evaluar la capacidad de inhibición de los extractos en contra de *S. mutans*.
3. Seleccionar los extractos de plantas con mayor capacidad de inhibición en contra de *S. mutans*.
4. Determinar la concentración necesaria de los extractos seleccionados para lograr un efecto inhibitorio en contra de *S. mutans*.

6.- Hipótesis.

Los extractos de plantas con base alcohólica tienen un efecto inhibitorio en contra de *S. mutans* en diferentes concentraciones, lo que proporcionará información que permita relacionar su efecto inhibitorio con el grupo de moléculas que pueden estar presentes.

7.- Metodología.

7.1.- Preparación de los extractos.

Todas las muestras de plantas que se usaron en este trabajo fueron compradas en mercados de Puebla, México. Para realizar la extracción alcohólica de las diferentes plantas se siguió la metodología recomendada por el libro “Nueva farmacopea homeopática”, la cual se resume en la tabla 4, para cada extracto la relación de muestra y de etanol se realizó con relación a la dureza, contenido de agua, y flexibilidad de la muestra (49).

Tabla 4: Resumen de la metodología descrita en “Nueva farmacopea homeopática”. En la columna “proporción” se explica la relación entre los gramos de planta y los mililitros de solvente utilizados.

Planta	Proporción	Gramos	Mililitros(OH)	Partes utilizadas
Orégano	1 * 3	25	75	Hojas
Manzanilla	1 * 1	50	50	Tallos, hojas y flores
Cilantro	1 * 3	25	75	Tallos y hojas
Romero	1 * 5	18	90	Tallos y hojas
Cebolla	1 * 2	50	100	Bulbo
Thuja	1 * 4	25	100	Corteza
Canela	1 * 4	25	100	Corteza

1. Cilantro: Del total de la muestra, se desecharon los tallos para obtener únicamente las hojas de la planta, se pesaron 25 gramos de hojas y se trituraron en un mortero, se agregaron las hojas a un recipiente ámbar a una concentración de 1:3 con 75 ml de etanol y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.
2. Canela: La muestra que se obtuvo en tiras fue cortada en trozos pequeños y se pesaron 25 gramos, los trozos de canela fueron depositados en un frasco ámbar con 100 ml etanol en una proporción de 1:4 y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.

3. Manzanilla: Del total de la muestra se utilizaron únicamente las hojas y flores de la planta, después de pesar 50 gramos, se trituro la muestra en un mortero y el producto fue agregado a un frasco ámbar con 50 ml de etanol en proporción de 1:1 y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.
4. Romero: La muestra que principalmente corresponde a tallos y hojas se cortó en pedazos pequeños, se pesaron 18 gramos y fue agregada a un frasco ámbar con 90 ml etanol en una proporción de 1:5 y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.
5. Cebolla: El bulbo de la planta fue cortado y picado, se pesaron 50 gramos y se trituró en un mortero, se agregó etanol con regularidad para llegar a 100 ml con una proporción de 1:2. El triturado fue depositado en un frasco ámbar y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.
6. Thuja: La muestra de corteza que se obtuvo fue cortada en trozos pequeños, se pesaron 25 gramos, los trozos de thuja fueron depositados en un frasco ámbar con 100 ml de etanol en una proporción de 1:4 y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.
7. Orégano: Del total de la muestra se desecharon los tallos para obtener únicamente las hojas de la planta, se pesaron 25 gramos de hojas y se trituraron en un mortero, se agregaron las hojas a un recipiente ámbar con una concentración de 1:3 con 75 ml de etanol y se dejó reposar una semana con agitación periódica de 3 veces por día.

Posterior a una semana se usó papel filtro de 15 cm de diámetro, cualitativo 85 GSM para filtrar todas las muestras y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente. Antes de su uso en laboratorio los extractos se filtraron usando un filtro de jeringa PVDF Durapore[®] de 0.22µm con la finalidad de eliminar agentes biológicos contaminantes.

Ensayos de inhibición en contra de *S. mutans*.

7.2.- Método por halo de inhibición

Las concentraciones de los extractos se determinaron partiendo del extracto madre, tomándolo como el 100% y diluyendo con etanol o agua para cada una de las pruebas. Las concentraciones que se obtuvieron fueron del 100% para la tintura madre, 50%, preparación en partes iguales del extracto original y el solvente empleado y 25% (Figura 10).

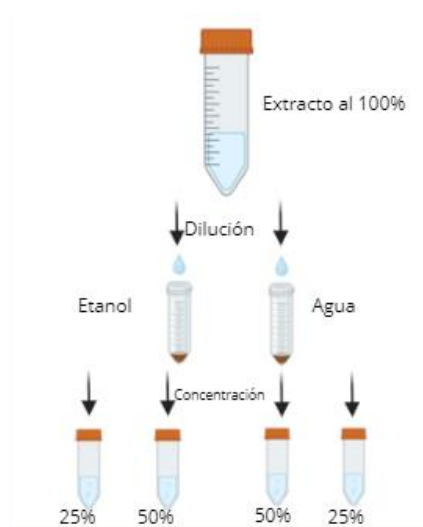


Figura 10: Preparación de las diluciones al 50% y 25% para cada extracto.

Siguiendo la metodología propuesta por Hachity y colaboradores (50), a partir de un cultivo “overnight” de *S. mutans* en medio líquido infusión cerebro corazón (“Brain Heart Infusion”-BHI) crecida a 37°C, en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono se tomaron 100 µL de muestra para realizar el conteo de UFC usando el método de Goteo en placa por sellado masivo (GSPM) (51,52). Adicionalmente En cajas Petri con medio sólido BHI se agregaron 100 µl del cultivo de *S. mutans* y con ayuda de un asa de drigalsky la muestra se esparció por toda la superficie de la placa de manera uniforme para posteriormente colocar 20 µl de cada uno de los extractos que se evaluaron a diferentes concentraciones: 100%, 50% y 25% en dilución alcohólica y acuosa.

Como control se usaron:

1. Control positivo, agua.
2. Control positivo, etanol al 70%.
3. Control negativo, Clorhexidina Lacer® Colutorio 0.20%

Las cajas Petri inoculadas con *S. mutans*, preparadas para determinar la efectividad de las muestras, se llevaron a incubar a 37 °C durante 24 horas bajo condiciones anaerobias (Figura 11).

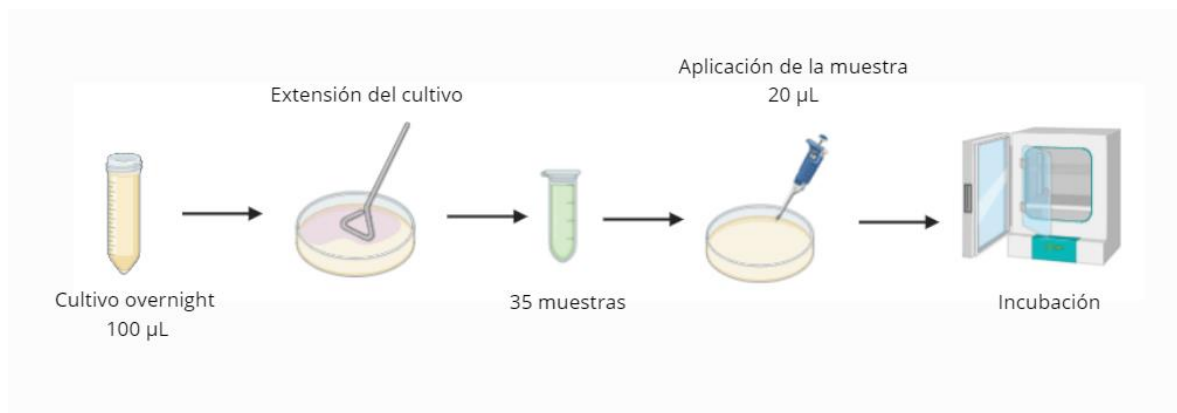


Figura 11: Resumen del procedimiento para determinar halo de inhibición

7.3.- Método de dilución en caldo con sembrado masivo.

Para determinar de manera cualitativa que extractos tienen capacidad antimicrobiana se realizaron múltiples ensayos en placas multipozos donde *S. mutans* creció en presencia de cada uno de los extractos a diferentes concentraciones en medio líquido BHI. En cada pozo de la placa se colocaron 150 µl de medio de cultivo BHI, 15µl de cada uno de los extractos a las diferentes concentraciones antes mencionadas y un inóculo de *S. mutans* obtenido de un cultivo overnight. Cuidando que el número de UFC iniciales en cada experimento fuera el mismo. En el diseño experimental se tomaron como control positivo el crecimiento de *S. mutans* en ausencia de extracto. El control negativo fue establecido en relación con el crecimiento de *S. mutans* en presencia de clorhexidina. Finalmente se verificó la esterilidad de cada extracto colocando una muestra de 50 µL en pozos individualmente.

(Representado en la tabla como “Planta-Estéril”) (Anexo 1). Cada una de las muestras se colocó por triplicado.

Para realizar la evaluación de la capacidad antimicrobiana se tomaron muestras en diferentes tiempos 30 min y 24 horas posteriores a la colocación de los extractos para determinar el efecto en el crecimiento de *S. mutans*. Con ayuda de un replicador se realizó el sembrado masivo de las muestras en placas con medio sólido BHI y junto con la placa multipozos donde se encontraban las muestras *S. mutans*-extracto, se llevaron a incubación a 37 °C en una atmósfera enriquecida con CO₂. Después de 24 horas se evaluó el crecimiento de cada repetición de sembrado masivo (Figura 12).

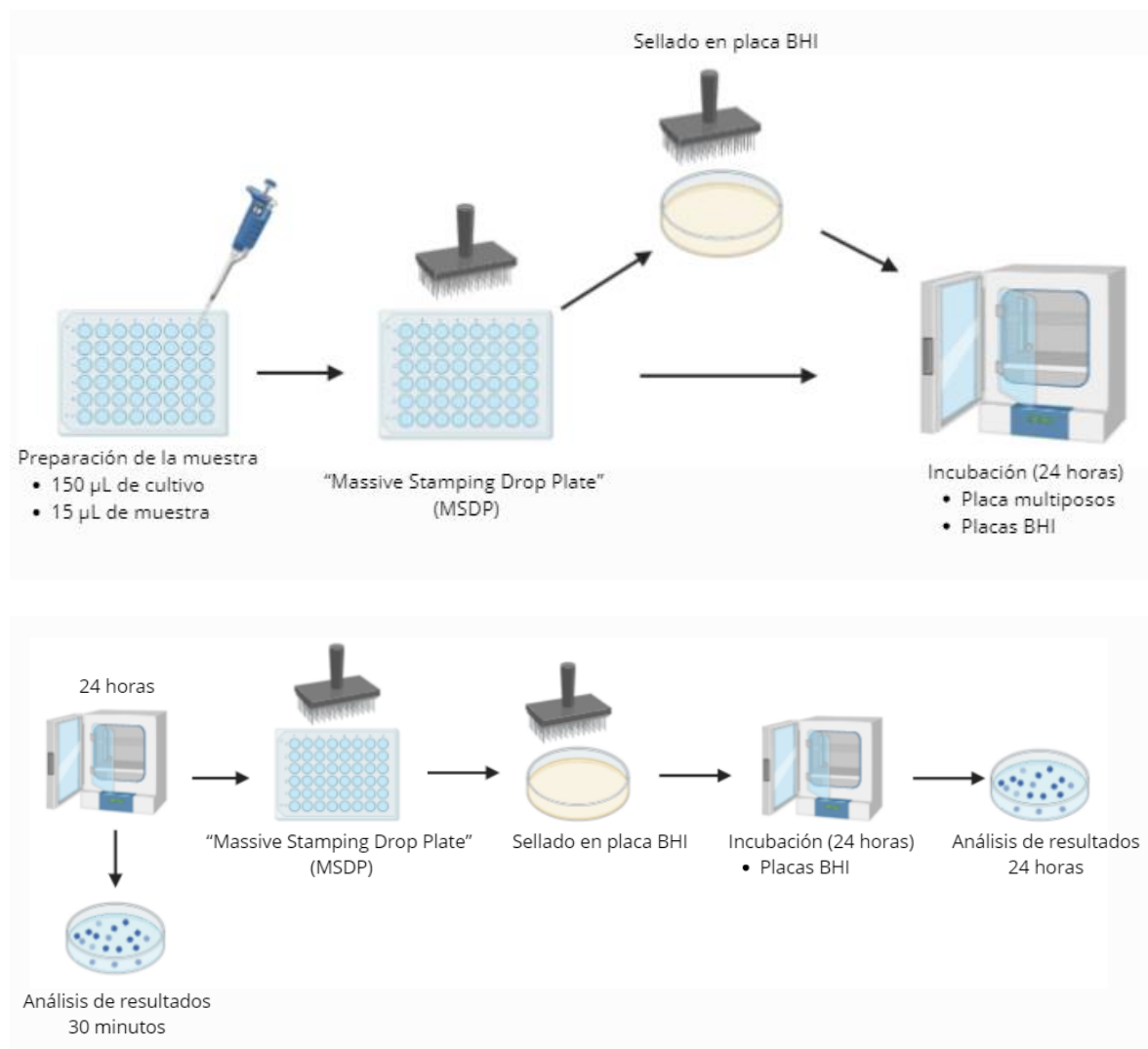


Figura 12: Resumen de la metodología realizada en el método de dilución en caldo con sembrado masivo.

7.4.- Determinación cuantitativa del efecto inhibitorio de extractos de plantas

Después de la observación cualitativa del efecto inhibitorio en contra de *S. mutans* de los diferentes extractos probados, se seleccionaron los que presentaron una mayor actividad antimicrobiana siendo canela, romero y Thuja.

En tubos falcón de fondo cónico de 15 ml se colocaron 5 ml de medio líquido BHI que se inocularon con el volumen de cultivo overnight de *S. mutans* suficiente para ajustar a una densidad óptica de 0.05 y agregando 500 μ L de cada extracto a diferentes concentraciones y solventes (figura 13).

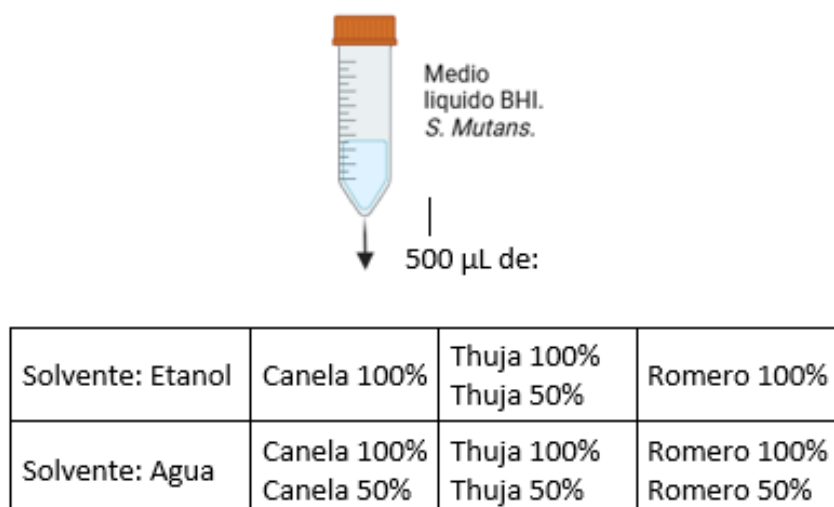


Figura 13: Preparación de las muestras *S. mutans*-extracto a diferentes concentraciones.

Como controles se usaron:

1. Control positivo: *S. mutans* y medio BHI.
2. Control negativo: *S. mutans* y 500 μ l de clorhexidina.
3. Control positivo: *S. mutans* y 500 μ l de etanol al 70%.

Posteriormente a la preparación de la muestra, se tomaron volúmenes de 20µl de cada tubo para realizar diluciones seriadas usando el método de Goteo en placa por sellado masivo (51). Para la determinación de UFC/ml se realizaron 5 repeticiones para cada muestra, en placas con medio sólido BHI. Las placas de BHI inoculadas y los 12 tubos de *S. mutans* con y sin extractos se incubaron por 24 horas a 37 °C bajo condiciones anaerobias. Después de ese tiempo se contaron las UFC presentes. Correspondiente a los tubos, se tomaron nuevamente muestras de 20 µL para realizar diluciones seriadas usando la metodología antes descrita, incubando por 24 horas para realizar el conteo de las UFC presentes (figura 14).

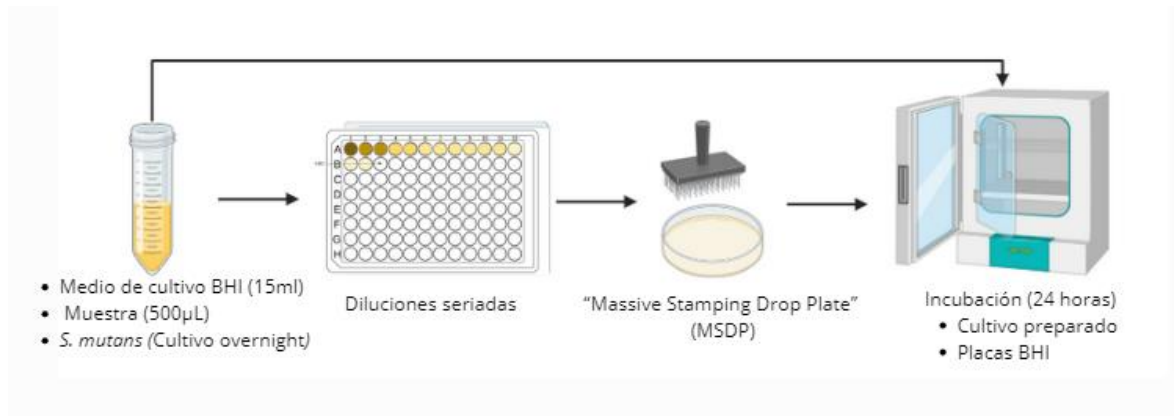


Figura 14: Resumen del procedimiento realizado para la determinación de UFC.

8.- Resultados:

8.1.- Método por halo de inhibición

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos mediante la técnica de halo de inhibición, se observó que el etanol al 70% y la clorhexidina tuvieron un efecto antimicrobiano positivo contra *S. mutans*, mientras que la muestra de agua no mostró un efecto inhibitorio. Para el caso del alcohol se generó un halo de inhibición pequeño con algunas colonias en el centro y finalmente clorhexidina generó una amplia zona de inhibición donde no se visualiza crecimiento (figura 15).

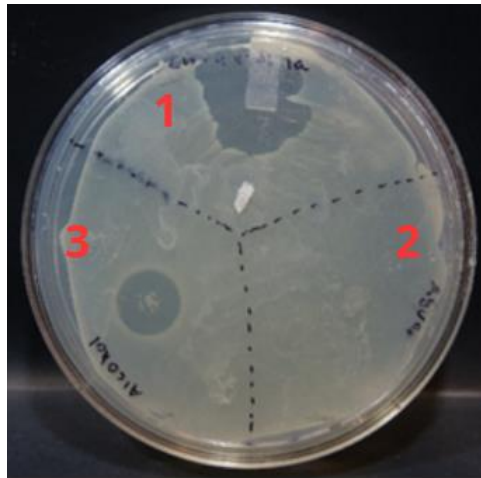


Figura 15: Caja Petri con medio sólido BHI, inoculada por toda la superficie con *S. mutans*, donde se depositaron 3 muestras control: 1.-clorhexidina 2.-agua 3.- alcohol.

El resto de los resultados se explican en la siguiente tabla 5 con código de color, donde el efecto de inhibición cambia junto con el color de la celda:

Tabla 5: Resultados de la prueba de inhibición por halo de inhibición para 35 muestras.

Planta	Alcohol			Agua	
Orégano	100%	50%	25%	50%	25%
Manzanilla	100%	50%	25%	50%	25%
Cilantro	100%	50%	25%	50%	25%
Romero	100%	50%	25%	50%	25%
Cebolla	100%	50%	25%	50%	25%
Thuja	100%	50%	25%	50%	25%
Canela	100%	50%	25%	50%	25%

Sin efecto de inhibición.	Bajo efecto de inhibición.	Inhibición moderada.	Inhibición total.
---------------------------	----------------------------	----------------------	-------------------

Como se muestra en la tabla los extractos diluidos en alcohol mostraron un mayor efecto inhibitorio, sin embargo, al obtener una inhibición por parte del etanol al 70% estos resultados no pueden ser concluyentes para determinar que los compuestos presentes en los diferentes extractos contienen sustancias antimicrobianas capaces de inhibir a *S. mutans*.

8.2.- Método de dilución en caldo con sembrado masivo

Para comprobar si los extractos diluidos en alcohol podrían tener un efecto inhibitorio se realizó una evaluación del crecimiento de *S. mutans* en presencia de cada uno de los extractos usando los mismos controles antes mencionados. La evaluación se realizó en dos tiempos experimentales 30 minutos y 24 horas. En la tabla 6 se observa que ninguno de los extractos evaluados fue capaz de inhibir a *S. mutans* en un tiempo de contacto de 30 min. El control de alcohol fue incapaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* y *S. mutans* sin presencia de extracto y etanol creció de manera óptima. Por su parte se observó que la clorhexidina es capaz de inhibir por completo el crecimiento de *S. mutans* con un corto tiempo de contacto.

Tabla 6: Inhibición de S. mutans con 30 minutos de contacto con los extractos naturales.

Tiempo	Planta	Sensibilidad	Grado
0 Horas	Orégano	Negativo	-
	Manzanilla	Negativo	-
	Cilantro	Negativo	-
	Romero	Negativo	-
	Cebolla	Negativo	-
	Thuja	Negativo	-
	Canela	Negativo	-
	Alcohol	Negativo	-
	<i>S. mutans</i>	Presente	***

poco crecimiento, **crecimiento afectado, *crecimiento optimo.*

Se muestra el resultado de 9 repeticiones para cada extracto.

Al evaluar el grado de efectividad de los extractos contra *S. mutans* tras estar 24 horas en contacto se observó que el extracto de orégano al 100% presentó un grado muy pequeño de inhibición. Por su parte los extractos de manzanilla, cilantro, romero y cebolla presentaron una actividad inhibitoria en concentraciones del 100% y 50%. Finalmente, Thuja y canela, resaltados en verde, presentaron actividad inhibitoria en concentraciones de 100%, 50%.

Tabla 7: Inhibición de *S. mutans* con 24 horas de contacto con los extractos naturales.

Tiempo	Planta	Sensibilidad	Grado
24 Horas	Orégano	Positivo	+
	Manzanilla	Positivo	++
	Cilantro	Positivo	++
	Romero	Positivo	++
	Cebolla	Negativo	-
	Thuja	Positivo	+++
	Canela	Positivo	+++
	Alcohol	positivo	+
	<i>S. mutans</i>	Presente	***

*poco crecimiento, **crecimiento afectado, ***crecimiento óptimo.

+ Sensibilidad con extracto al 100%, ++ Sensibilidad con extracto al 50%, +++Sensibilidad con extracto al 25%.

Se muestra el resultado de 9 repeticiones para cada extracto.

Adicionalmente se evaluó si los extractos diluidos con agua eran capaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans*. Para esto se siguió la misma metodología y los mismos tiempos experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8 donde se observa que ninguno de los extractos evaluados fue capaz de inhibir a *S. mutans* en un tiempo de contacto de 30 min. El control de clorhexidina presentó una fuerte actividad inhibitoria impidiendo el crecimiento de *S. mutans*, mientras que *S. mutans* fue capaz de crecer de manera óptima.

Tabla 7: Inhibición de *S. mutans* con 30 minutos de contacto con los extractos naturales diluidos en agua.

Tiempo	Planta	Sensibilidad	Grado
0 Horas	Orégano	Negativo	-
	Manzanilla	Negativo	-
	Cilantro	Negativo	-
	Romero	Negativo	-
	Cebolla	Negativo	-
	Thuja	Negativo	-
	Canela	Negativo	-
	Clorhexidina	Positivo	+++
	<i>S. mutans</i>	Presente	***

poco crecimiento, **crecimiento afectado, *crecimiento optimo*

+ Sensibilidad con extracto al 100%, ++ Sensibilidad con extracto al 50%, +++Sensibilidad con extracto al 25%

Se muestra el resultado de 9 repeticiones para cada extracto.

Después de 24 horas de contacto con los diferentes extractos diluidos en agua se observó que los extractos de orégano y cebolla no lograron mostrar actividad inhibitoria, para el caso de extractos de cilantro y canela al 100% se observó un efecto inhibitorio contra *S. mutans*. Los extractos de manzanilla, romero y Thuja fueron los extractos más sobresalientes mostrando actividad de inhibición a concentraciones del 100 % y 50%. *S. mutans* presento buen crecimiento. El efecto inhibitorio total de la clorhexidina se mantuvo durante todo el experimento.

Tabla 9: Inhibición de S. mutans con 24 horas de contacto con los extractos naturales diluidos en agua.

Tiempo	Planta	Sensibilidad	Grado
24 Horas	Orégano	Negativo	-
	Manzanilla	Positivo	++
	Cilantro	Positivo	+
	Romero	Positivo	++
	Cebolla	Negativo	-
	Thuja	Positivo	++
	Canela	Positivo	+
	Clorhexidina	Positivo	+++
	S. mutans	Presente	***

poco crecimiento, **crecimiento afectado, *crecimiento optimo*

+ Sensibilidad con extracto al 100%, ++ Sensibilidad con extracto al 50%, +++Sensibilidad con extracto al 25%

Se muestra el resultado de 9 repeticiones para cada extracto.

8.3.- Determinación cuantitativa del efecto inhibitorio de extractos de plantas.

Tomando en consideración los resultados obtenidos con la metodología de dilución en caldo con sembrado masivo. Se evaluaron los extractos que tuvieron un mayor efecto inhibitorio en contra de *S. mutans* para determinar de manera cuantitativa el efecto inhibitorio de estos. Nuevamente se evaluaron extractos diluidos en etanol y agua.

Pruebas de inhibición de extractos en dilución alcohólica.

Al realizar la incubación directa y determinación de UFC/ml se observó que el número de UFC/ml de *S. mutans* aumentó a las 24 horas posteriores de la incubación, partiendo de $\log 6.94 \pm 0.1$ a $\log 8.13 \pm 0.32$ lo que indica una correcta manipulación del microorganismo (Figura 16-17). Para el caso del crecimiento en presencia de alcohol, el número de UFC/ml se vio reducido, indicando una parcial acción inhibitoria del etanol en contra de *S. mutans*. Resulta interesante que el crecimiento en presencia de los extractos de romero y canela al 100% y Thuja al 100% y 50% se observó totalmente inhibido (figura 16).

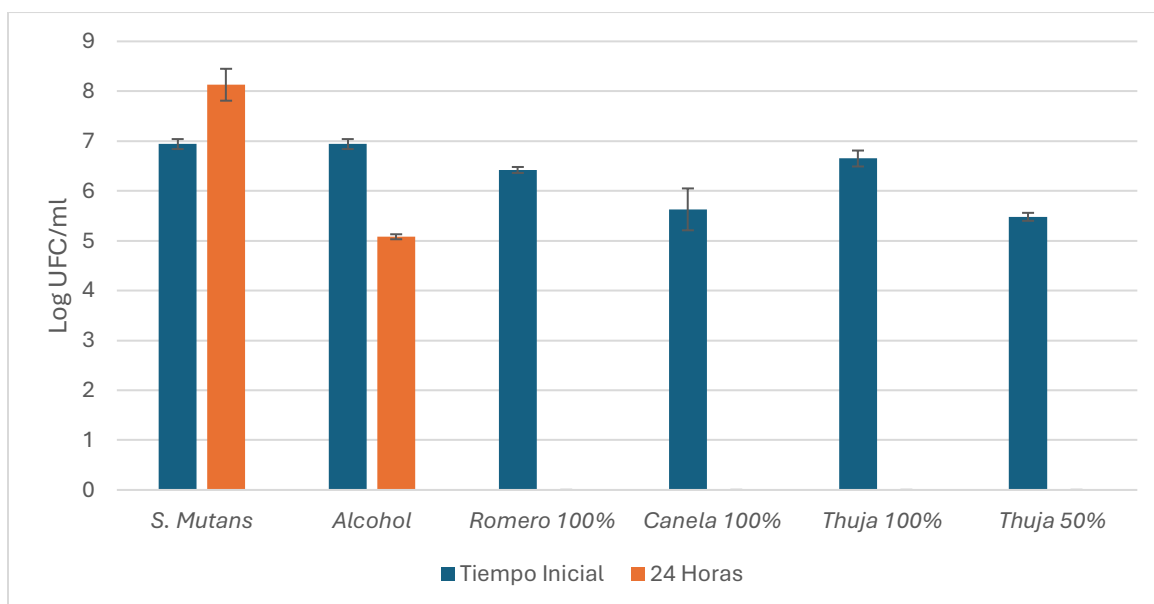


Figura 16: Logaritmo de UFC/ml de *S. mutans* creciendo en presencia de extractos de romero, canela y Thuja después de 30 min de contacto y 24 horas. Cada barra representa la media de 5 repeticiones.

Después de los resultados observados en las pruebas en dilución alcohólica, se decidió evaluar si una concentración menor al 50% tenía la capacidad de presentar un efecto inhibitorio en contra de *S. mutans*. Los resultados observados mostraron que el número de UFC/ml para *S. mutans* aumentó desde el tiempo inicial de $\log 6.39 \pm 0.21$ al tiempo 24 horas con $\log 6.91 \pm 0.14$, lo que indica una correcta manipulación del microorganismo. Para el caso de crecimiento en presencia de alcohol el número de UFC/ml se vio reducido, indicando la parcial acción inhibitoria del etanol en el medio, como se había observado previamente. (Figura17).

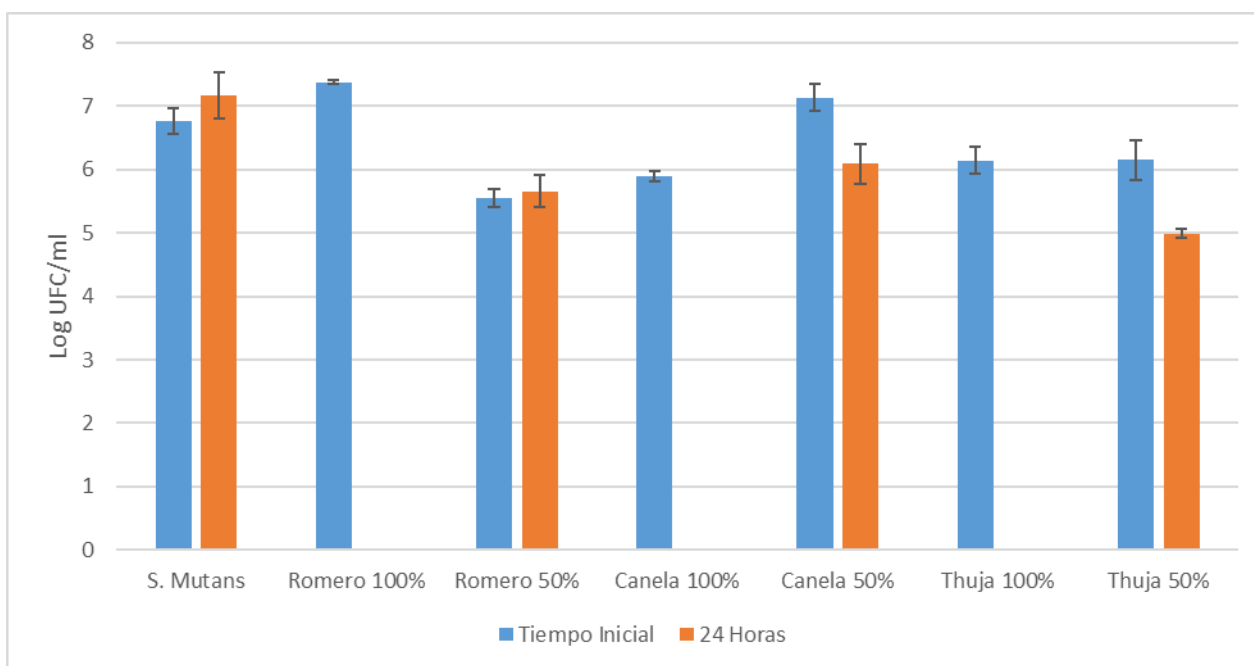


Figura 17: Logaritmo de UFC/ml de *S. mutans* creciendo en presencia de extractos de romero, canela y Thuja después de 30 min de contacto y 24 horas. Cada barra representa la media de 5 repeticiones.

Respecto al crecimiento con los extractos de romero, canela y Thuja al 25% no se obtuvo un efecto inhibitorio. (figura 18).

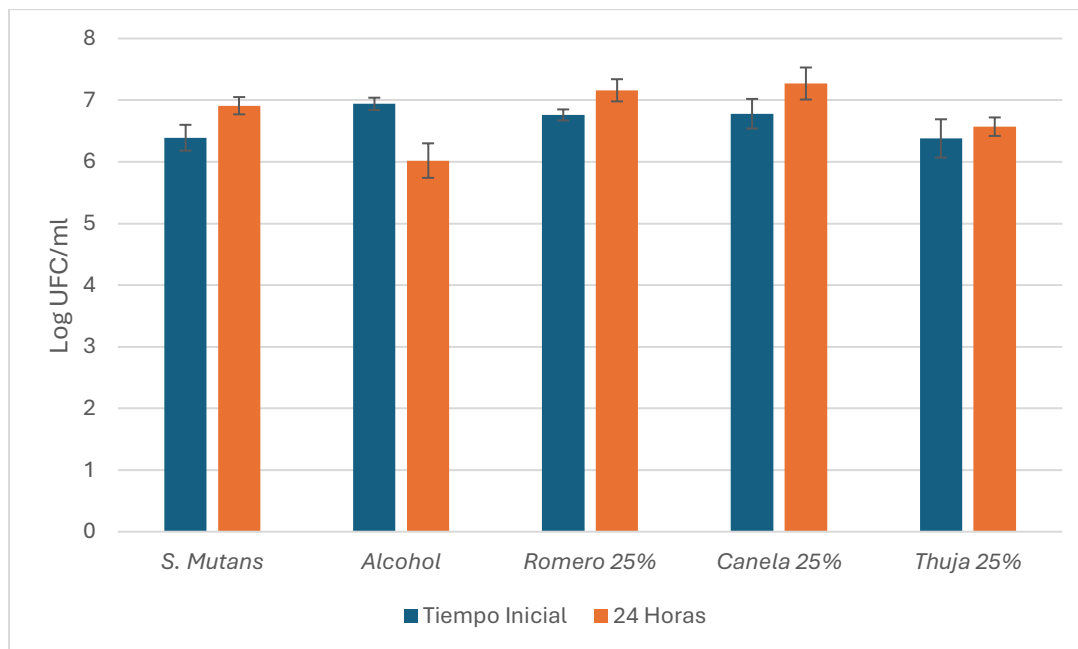


Figura 18: Logaritmo de UFC/ml de S. mutans creciendo en presencia de extractos de romero, canela y Thuja al 25% después de 30 min de contacto y 24 horas. Cada barra representa la media de 5 repeticiones.

Pruebas de inhibición de extractos diluidos en agua.

Los resultados obtenidos muestran que el número de UFC/ml de *S. mutans* aumentó desde $\log 6.77 \pm 0.2$ en el tiempo inicial, a $\log 7.17 \pm 0.36$ tiempo 24 horas, lo que indica una correcta manipulación del microorganismo. Para el crecimiento en presencia de romero y canela al 100% se visualizó un efecto de inhibición fuerte. En las muestras que crecieron en presencia de los extractos de romero al 50% diluidos con agua, no se observó un efecto inhibitorio en contra de *S. mutans*. Para el caso del crecimiento en presencia de extractos de canela y Thuja al 50% diluidos con agua se observó una parcial inhibición en contra de *S. mutans*, siendo más notoria en presencia de Thuja. En el resto de las columnas el efecto de inhibición es débil, manteniendo un número similar de UFC en romero 50% y reduciendo las UFC en canela, Thuja y canela al 50% (figura 19). Estos resultados sugieren que los compuestos con actividad inhibitoria son mayormente solubles en etanol que en agua.

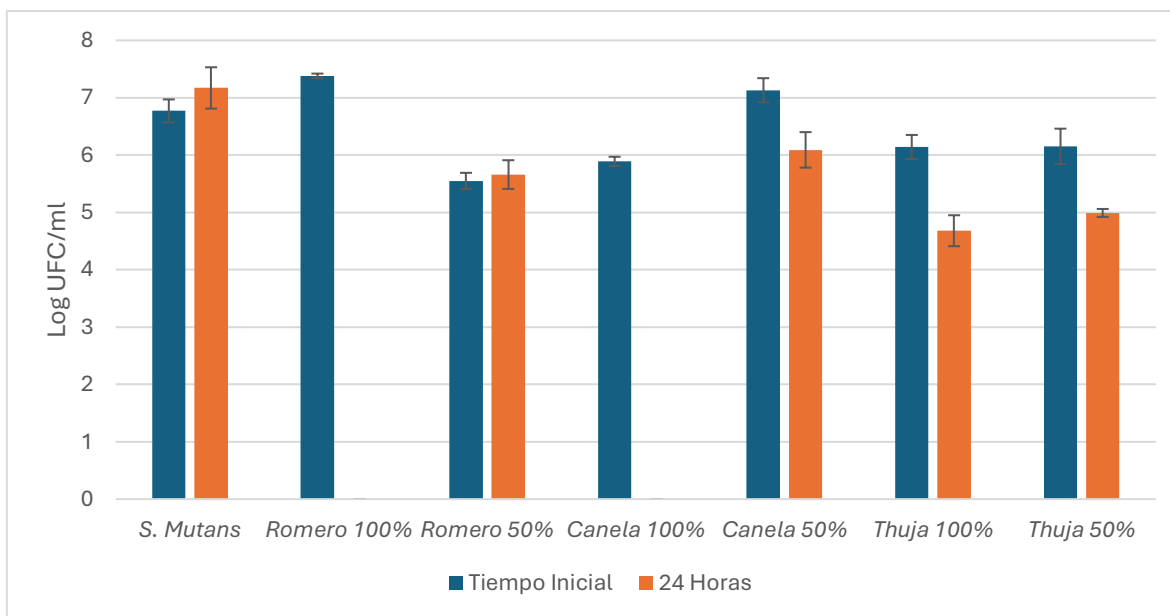


Figura 19. Logaritmo de UFC/ml de *S. mutans* creciendo en presencia de extractos de romero, canela y Thuja a diferentes concentraciones diluidos con agua después de 30 min de contacto y 24 horas. Cada barra representa la media de 5 repeticiones.

Como se muestra en la tabla los extractos diluidos en alcohol mostraron un mayor efecto inhibitorio, sin embargo, al obtener una inhibición por parte del etanol al 70% estos resultados no pueden ser concluyentes para determinar que los compuestos presentes en los diferentes extractos contienen sustancias antimicrobianas capaces de inhibir a *S. mutans*.

Para mayor referencia de los valores numéricos exactos se muestran las tablas en el anexo 2.

9.- Discusión

El estudio de extractos de origen vegetal y su capacidad de inhibición en contra de bacterias que impactan de manera negativa a la salud humana principalmente ha sido de gran importancia y relevancia para el avance en el combate de enfermedades de origen bacteriano. En esta investigación se buscaron sustancias de origen vegetal con actividad antimicrobiana en contra de *S. mutans* proponiéndolas como posibles sustancias para ayudar en el tratamiento de la caries dental. Una de las metodologías más ampliamente usadas para determinar la capacidad antimicrobiana de diferentes sustancias es determinar la sensibilidad a la sustancia evaluada en relación con el tamaño del diámetro de un halo de inhibición formado (50, 53,54).

En este estudio se evaluó el efecto antimicrobiano de los diferentes extractos usando esta técnica. Los resultados obtenidos mostraron un efecto inhibitorio por parte del etanol sobre *S. mutans*, por lo tanto, los resultados positivos que se obtuvieron de las muestras diluidas con este solvente perdieron credibilidad y el método fue descartado. En la literatura se encuentra reportado que el tiempo de contacto y la concentración en la que se suministra el etanol, son los factores principales que influyen en la actividad antiséptica del etanol (55). Se sabe que cuando el etanol al igual que otros alcoholes es aplicado sobre superficies es capaz de actuar en las membranas biológicas fundamentalmente de 3 formas: 1) alterando la fluidez de las membranas, lo que indirectamente afectaría el funcionamiento de las proteínas como enzimas y canales; 2) produciendo una deshidratación a nivel de las membranas 3) interactuando directamente con las proteínas de la membrana (56). Este factor podría explicar

por qué *S. mutans* fue incapaz de crecer en la muestra control en el experimento por halo de inhibición al ser expuesta a etanol al 70%.

Sin embargo, en el resto de los resultados con etanol diluido en medio líquido BHI la concentración del alcohol bajó considerablemente pasando del 70% al 9%, 4.5% y 2.25% en el medio, adicionando la intervención de los compuestos vegetales.

La acción de la clorhexidina como control negativo en los experimentos fue muy eficiente, teniendo actividad inhibitoria desde los 30 min de contacto, comprobando su efecto inhibitorio sobre *S. mutans* (57). La clorhexidina es usada como un agente antibacteriano de amplio espectro, con capacidad de inhibir la actividad proteolítica de enzimas que pueden degradar las fibras colágenas de la capa híbrida en diferentes trabajos estomatológicos (58). La clorhexidina se une a las células del epitelio y a proteínas presentes en la saliva, para posteriormente ser liberado lentamente llegando a tener efecto antiséptico durante 8 a 13 horas. En altas concentraciones, tiene acción bactericida debido a que provoca cambios en la estructura de la superficie bacteriana, con lo que se pierde el equilibrio osmótico, aumenta la permeabilidad, y se produce una ruptura de la membrana citoplasmática, por tanto, provoca la precipitación de citoplasma y la lisis o muerte bacteriana. A bajas concentraciones la acción de la clorhexidina sólo es bacteriostática, interfiriendo en el mecanismo de transporte mediado por fosfoetanolpiruvato fosfotransferasa, con la consecuente reducción en la producción de ácido por las bacterias, lo que también altera la permeabilidad de la membrana citoplasmática (59).

Los resultados de la mayoría de los extractos con un tiempo de interacción de 24 horas resultan prometedores. De acuerdo con los resultados obtenidos se eligieron tres extractos que lograron una eficiente inhibición en contra de *S. mutans*. Los extractos elegidos fueron: canela, romero y Thuja. Dentro de la investigación de sustancias de origen vegetal en contra de *S. mutans*, se han usado especies vegetales como *Pongamia pinnata* (Asia), *Cymbopogon citratus* (zacate limón zacate limón, Asia meridional), *Azadirachta indica* (lila india, India) y *Psidium guajava* (guayabo, América tropical) (60). Esta investigación encontró que los extractos de hojas y aceites esenciales derivados de *P. pinnata*, *C. citratus*, *A. indica* y *P. guajava* poseen una notable actividad antibacteriana contra *S. mutans*. (Tabla 10). Cabe resaltar que estos resultados muestran resultados de efecto inhibitorio usando la técnica de

halo de inhibición. En su trabajo describen metodologías como la cromatografía de gases y el análisis de acoplamiento molecular como estrategias para caracterizar y describir los compuestos responsables de la actividad inhibitoria.

Otras metodologías que se han usado para evaluar la actividad antimicrobiana incluyen curvas de crecimiento microbiológico las cuales resultan útiles para monitorear la actividad en el aumento o descenso de UFC en el tiempo. Un ejemplo clásico de esto es el estudio, efecto de la persistencia bacteriana sobre la eficacia de la enrofloxacin y ciprofloxacina frente a una cepa de *Escherichia coli* donde se evaluaron las concentraciones necesarias de este medicamento para inhibir el crecimiento de *E. coli*, donde se encontró que ningún antibiótico presentó actividad bactericida y solo permitieron la sobrevivencia de bacterias persistentes. Otro ejemplo de la aplicación de las curvas de crecimiento y muerte radica en la investigación sobre la eficiencia de aceites esenciales de orégano, tomillo y hojas de clavo en contra de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. teniendo resultados positivos que variaban principalmente según el tratamiento al que fueron sometidos en la industria de alimentos (61).

En este trabajo se midió el efecto de inhibición de los extractos etanólicos únicamente en dos tiempos, uno inicial de 30 min y 24 horas posteriores de interacción. Los resultados señalan que ninguno de los extractos evaluados lograron afectar el crecimiento de *S. mutans* de manera considerable con 30 minutos de interacción. Los resultados con 24 de interacción mostraron un efecto antimicrobiano eficaz. Con esta metodología no es posible establecer cuál es el tiempo mínimo de interacción que se requiere para observar una actividad inhibitoria eficaz, por lo que este estudio podría ser de utilidad en la continuidad de la investigación (62).

Con los resultados obtenidos en este trabajo se ha podido determinar la concentración más eficiente para observar una actividad antimicrobiana efectiva que fue superior al 25% para 3 de nuestros extractos. Schovelin-H *et al.* reportó ensayos de inhibición con concentraciones del 1%, 5% y 10%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de un extracto preparado a partir de agua destilada y hojas de orégano, describió una efectiva inhibición en contra de *S. mutans* para las concentraciones superiores al 20% (63). Además, Solano *et al.*, mostraron

que cuando se usa una concentración de 1.5% y 3% de extracto acuoso de romero no se obtiene una eficiente actividad antimicrobiana en contra de *S. mutans*, mientras que con un extracto oleoso al 50% de la misma planta, si se obtiene un efecto de inhibición similar al de la clorhexidina (64). De acuerdo con estos estudios nuestra investigación muestra que para obtener una actividad antimicrobiana en contra de *S. mutans* se requiere una concentración mayor de lo que ha sido reportado, esto puede ser causado por las diferencias en complejidad de extracción, a la diversidad de moléculas vegetales y a escoger distintos solventes y procedimientos de extracción (65)(66)

La importancia de la metodología utilizada en este estudio radica en el análisis masivo de muestras en un breve periodo de tiempo, así como la optimización del espacio y del material de laboratorio. Por cada caja Petri se pueden analizar resultados de hasta 46 muestras diferentes. Así como posteriormente determinar no solo cualitativamente si *S. mutans* es sensible a un posible agente antimicrobiano, si no determinar de manera cuantitativa este efecto al comparar el número de UFC/ml en interacción con cada extracto evaluado. Algunos autores han usado metodologías para determinar concentración mínima inhibitoria (MIC) evaluando otros microorganismos y otras compuestos de origen vegetal, por ejemplo, un estudio con soluciones de miel y diversas bacterias Gram positivas y negativas como; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*. Reveló una actividad antibacteriana positiva de mieles derivadas de la flora endémica del sudoeste de Australia Occidental con una MIC de 6,7-28,0% (p/v) (67).

En esta investigación se destaca la importancia de señalar específicamente la molécula o el grupo de compuestos responsables de la acción inhibitoria observada en contra de *S. mutans*. Para lograr esta perspectiva se sugiere el uso de herramientas bioinformáticas como lo es el acoplamiento molecular (docking) donde se estudia como interactúan dos o más moléculas en diferentes medios (68). Así como el filtrado de moléculas similares, buscando candidatos entre especies vegetales relacionadas taxonómicamente. Así estas herramientas pueden estudiar la acción de las sustancias naturales en los diferentes procesos vitales en la propagación, vida y replicación de *S. mutans* y otras bacterias fundamentales en el desarrollo de la caries dental.

10.- Conclusiones

Los extractos etanólicos que presentaron una mayor actividad antimicrobiana en contra de *S. mutans* fueron canela, romero y Thuja. Su efecto es visible cuando los extractos etanólicos están presentes en el medio líquido en concentraciones mayores a 2.5% del volumen total.

Los extractos diluidos en agua no presentaron una actividad antimicrobiana en contra de *S. mutans* eficiente.

El efecto inhibitorio de los extractos vegetales se observa a las 24 horas de interacción.

El etanol no es capaz de inhibir por completo el crecimiento de *S. mutans*. Los extractos etanólicos evaluados en este trabajo demostraron tener la capacidad de inhibir en su totalidad el crecimiento de *S. mutans* dependiendo de la concentración.

El extracto etanólicos de Thuja tiene la mayor capacidad de inhibición en contra de *S. mutans* a una concentración del 50% y 100%

Son necesarios más estudios para determinar el grupo de moléculas responsables del efecto inhibitorio en contra de *S. mutans* para los extractos con resultados positivos y eficientes.

11.- Bibliografía.

1. Cruz Palma G, Rosa Isela Sánchez Najera DC, Miguel Ángel Quiroga García C, Carlos Galindo Lartigue C, Israel Martínez González G. Caries dental y los determinantes sociales de la salud en México Dental caries and social determinants of health in Mexico [Internet]. Vol. 51, Revista Cubana de Estomatología. 2014. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
2. del Rio Gomez I. Dental caries and mutans streptococci in selected groups of urban and native Indian schoolchildren in Mexico. Community Dent Oral Epidemiol. el 29 de abril de 1991;19(2):98–100.
3. Ito T, Maeda T, Senpuku H. Roles of Salivary Components in Streptococcus mutans Colonization in a New Animal Model Using NOD/SCID.e2f1–/– Mice. PLoS One. el 21 de febrero de 2012;7(2):e32063.
4. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiol Rev. junio de 1980;44(2):331–84.
5. Negroni M. Microbiología estomatológica. 2a ed. Médica Panamericana, editor. Vol. 1. 2010.
6. venez. Microbiología De La Caries Dental. Acta Odontol Venez [Internet]. 2003 [citado el 12 de enero de 2025];41:293–4. Disponible en: http://homolog-ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652003000300018&lng=es.
7. Aguilera Galaviz Luis Alejandro. Streptococcus mutans en saliva y su relación con caries dental. Revista AMD. 2009;6:48–56.
8. Sánchez Medina JG, Aranda Romo S, Martínez Martínez RE, Comas García M, Aragón Martínez OH. Prebióticos orales: alternativa para el tratamiento y prevención de caries. Revista Digital Universitaria. el 27 de mayo de 2023;24(4).
9. Sabharwal A, Stellrecht E, Scannapieco FA. Associations between dental caries and systemic diseases: a scoping review. BMC Oral Health. el 25 de septiembre de 2021;21(1):472.
10. Taheri JB, Azimi S, Rafieian N, Akhavan Zanjani H. Herbs in dentistry. Int Dent J. diciembre de 2011;61(6):287–96.

11. Gunjan Kumar et al. Emerging Trends of Herbal Care in Dentistry. JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH. 2013;
12. Milutinovici RA, Chioran D, Buzatu R, Macasoi I, Razvan S, Chioibas R, et al. Vegetal Compounds as Sources of Prophylactic and Therapeutic Agents in Dentistry. Plants. el 10 de octubre de 2021;10(10):2148.
13. Nigenda Gustavo, Mora-Flores Gerardo, Aldama-López Salvador, Orozco-Núñez Emanuel. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. Salud Publica Mex [Internet]. 2000;43:41–51. Disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>
14. Villarreal-Ibarra EC, García-López E, López PA, Palma-López DJ, Lagunes-Espinoza L del C, Ortiz-García CF, et al. PLANTAS ÚTILES EN LA MEDICINA TRADICIONAL DE MALPASITO-HUIMANGUILLO, TABASCO, MÉXICO. Polibotanica [Internet]. 2014;(37):109–34. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62129967007>
15. Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. Crit Rev Food Sci Nutr. el 24 de agosto de 2015;55(10):1320–3.
16. Shaaban HAE, El-Ghorab AH, Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. Journal of Essential Oil Research. abril de 2012;24(2):203–12.
17. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod. diciembre de 2014;62:250–64.
18. Montero Zamora P. La caries dental y su asociación a determinados factores de riesgo, en preescolares de un centro de salud de la Coomunidad de Madrid, bajo los criterios diagnósticos de caries ICDAS II [Internet]. 2012 [citado el 25 de enero de 2024]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.14352/46570>
19. De Diputados C, Congreso De DH, Unión LA, Ley N. LEY GENERAL DE SALUD.
20. Elattar MM, Darwish RS, Hammoda HM, Dawood HM. An ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological overview of onion (*Allium cepa* L.). J Ethnopharmacol. abril de 2024;324:117779.
21. KP Greeshma, S Muthulingam, R Thamizselvi, G Pragadeeswara Venkatamani. Phytochemical analysis and a review on biological importance of *Allium cepa* L. GSC Advanced Research and Reviews. el 28 de febrero de 2020;2(2):018–24.

22. Teshika JD, Zakariyyah AM, Zaynab T, Zengin G, Rengasamy KR, Pandian SK, et al. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review. Crit Rev Food Sci Nutr. el 27 de junio de 2019;59(sup1):S39–70.
23. Ubessi C, Tedesco SB, de Bona da Silva C, Baldoni M, Krysczun DK, Heinzmann BM, et al. Antiproliferative potential and phenolic compounds of infusions and essential oil of chamomile cultivated with homeopathy. J Ethnopharmacol. julio de 2019;239:111907.
24. Mazokopakis EE, Vrentzos GE, Papadakis JA, Babalis DE, Ganotakis ES. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. Phytomedicine. enero de 2005;12(1–2):25–7.
25. Dai YL, Li Y, Wang Q, Niu FJ, Li KW, Wang YY, et al. Chamomile: A Review of Its Traditional Uses, Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Quality Control Studies. Molecules. el 23 de diciembre de 2022;28(1):133.
26. Singh N, Rao AS, Nandal A, Kumar S, Yadav SS, Ganaie SA, et al. Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition. Food Chem. febrero de 2021;338:127773.
27. Chakraborty A, Sankaran V, Ramar M, Chellappan DR. Chemical analysis of leaf essential oil of *Cinnamomum verum* from Palni hills, Tamil Nadu. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. 2015;8(3):476–9.
28. Sahib NG, Anwar F, Gilani A, Hamid AA, Saari N, Alkharfy KM. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): A Potential Source of High-Value Components for Functional Foods and Nutraceuticals- A Review. Phytotherapy Research. el 19 de octubre de 2013;27(10):1439–56.
29. Atrooz O, Al-Nadaf A, Uysal H, Kutlu HM, Sezer CV. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* L. extract and evaluation of their antibacterial, anti-inflammatory and antinociceptive activities. South African Journal of Botany. junio de 2023;157:219–27.
30. Goswami A, Ballabh L, Debasmita D, Mitra A. Spectral lights influence growth and metabolic efficiency leading to enhanced phytochemical contents of *Coriandrum sativum* L. Environ Exp Bot. diciembre de 2024;228:106021.
31. K. V. Peter. Handbook of Herbs and Spices. 1a ed. Vol. 3. 2006.
32. Ghamari Kargar P, Moodi Z, Bagherzade G, Nikoomanesh F. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of metal complexes derived from

Schiff base of quercetin extracted from *Origanum vulgare* L. Mater Chem Phys. abril de 2024;317:129207.

33. Jafari Khorsand G, Morshedloo MR, Mumivand H, Emami Bistgani Z, Maggi F, Khademi A. Natural diversity in phenolic components and antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) accessions, grown under the same conditions. Sci Rep. el 6 de abril de 2022;12(1):5813.
34. Nazir R, Qadir RU, Yousuf M, Sultan P, Nawchoo IA, Hassan QP. Exploring the efficacy of hormonal treatments and pre-sowing techniques on seed germination of *Salvia rosmarinus* Spenn. J Appl Res Med Aromat Plants. septiembre de 2024;42:100564.
35. Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J Exp Biol. 1999;37(2):124–30.
36. Niu D, Liu Z, Shen L, Zhou H, You M, Isman M, et al. Repellent and toxic effects of *Salvia rosmarinus* oil against *Liriomyza sativae*. Annals of Applied Biology. el 17 de septiembre de 2022;181(2):246–54.
37. Baran D. Arbor vitae, a guarantee of health | Arborele vieții, garant al sănătății. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 1991;95(3–4):347–9.
38. Küpeli Akkol E, İlhan M, Ayşe Demirel M, Keleş H, Tümen I, Süntar İ. Thuja occidentalis L. and its active compound, α -thujone: Promising effects in the treatment of polycystic ovary syndrome without inducing osteoporosis. J Ethnopharmacol. junio de 2015;168:25–30.
39. Bergey 1860-1937 DH (David H. Bergeys manual of determinative bacteriology : a key for the identification of organisms of the class schizomycetes [Internet]. Baltimore : The Williams & Wilkins Company, 1923.; 1923. Disponible en: <https://search.library.wisc.edu/catalog/999609836402121>
40. COYKENDALL AL. Proposal to Elevate the Subspecies of *Streptococcus mutans* to Species Status, Based on Their Molecular Composition. Int J Syst Bacteriol. el 1 de enero de 1977;27(1):26–30.
41. Whitman WB, editor. Systematic Bacteriology. New York, NY: Springer New York; 2009.

42. Wolf M, Koetschan C, Müller T. ITS2, 18S, 16S or any other RNA — simply aligning sequences and their individual secondary structures simultaneously by an automatic approach. *Gene*. agosto de 2014;546(2):145–9.
43. Lancefield RC. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *Journal of Experimental Medicine*. el 1 de abril de 1933;57(4):571–95.
44. Montes M, María García-Arenzana J. Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. octubre de 2007;25:14–20.
45. Clarke JK. ON THE BACTERIAL FACTOR IN THE ETIOLOGY OF DENTAL CARIES. 1924.
46. Ojeda-Garcés Juan Carlos, Oviedo-García Eliana, Salas Luis Andrés. *Streptococcus mutans* y caries dental. 2013.
47. Hung WC, Tsai JC, Hsueh PR, Chia JS, Teng LJ. Species identification of *mutans streptococci* by *groESL* gene sequence. *J Med Microbiol*. el 1 de septiembre de 2005;54(9):857–62.
48. Rojas-Sanchez F. Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Acta Odontologica Venezolana* [Internet]. enero de 2008;46:509–16. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652008000400020&nrm=iso
49. Zepeda Castañeda L. Nueva farmacopea homeopática. 1a ed. Vol. 1. 2006.
50. Hachity-Ortega JA, Jerezano-Domínguez A V., Pazos-Rojas LA, Flores-Ledesma A, Pazos-Guarneros D del C, Parra-Solar KA, et al. Effect of glycerol on properties of chitosan/chlorhexidine membranes and antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol*. el 15 de agosto de 2024;15.
51. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Martínez-Contreras RD, Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Rev Colomb Biotecnol*. 2012;14:147–56.
52. Hossain ML, Lim LY, Hammer K, Hettiarachchi D, Locher C. A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. *Antibiotics*. el 20 de julio de 2022;11(7):975.

53. Rico ROG, Arias FCH. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2007;5(2):68–79.
54. Cuadra Arauz EE, Gutiérrez Gaitán YY, Sánchez Gómez IE, Contreras Estrada SP. Diagnóstico de enfermedades bacterianas en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) y sensibilidad in vitro a bactericidas de uso agrícola. La Calera. el 3 de marzo de 2023;23(40).
55. Chambers ST, Peddie B, Pithie A. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. Journal of Hospital Infection. junio de 2006;63(2):193–6.
56. Elvir JR. Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. Rev Med Hondureña. 2003;61(1):20–4.
57. Steinberg D, Rothman M. Antibacterial effect of chlorhexidine on bacteria adsorbed onto experimental dental plaque. Diagn Microbiol Infect Dis. noviembre de 1996;26(3–4):109–15.
58. Utria Hoyos J, Pérez Pérez E, Rebolledo Cobos M, Vargas Barreto A. Características de las soluciones de clorhexidina al 2% y al 0,2% en preparaciones cavitarias en odontología: una revisión. Duazary. el 1 de mayo de 2018;15(2):181.
59. Cova Bustamante O, Paredes Troncos LG, Piscoya de Zebrauskas AP, Rojas Leandro KC, Henckell Sime CL del C. ANTISÉPTICOS ORALES: CLORHEXIDINA, FLÚOR Y TRICLOSÁN. Salud & Vida Sipanense. el 28 de junio de 2020;7(1):4–16.
60. Pallavi P, Sahoo PP, Sen SK, Raut S. Comparative evaluation of anti-biofilm and anti-adherence potential of plant extracts against *Streptococcus mutans*: A therapeutic approach for oral health. Microb Pathog. marzo de 2024;188:106514.
61. Ruíz González N. Evaluación de la efectividad antimicrobiana o antioxidante de aceites esenciales encapsulados por las técnicas de emulsión o emulsión - atomización en sistemas modelo o en alimentos. . [Puebla.]: Universidad de las Américas Puebla.; 2020.
62. Chen Y, Chen Y, Tang S, Tang B, He S. Real-time fluorescence growth curves for viable bacteria quantification in foods. Food Chem X. diciembre de 2024;24:101886.

63. Schovelin-H A, Muñoz-C M. Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans* , 2015. International journal of odontostomatology. diciembre de 2018;12(4):337–42.
64. Solano Solano XK, Moya Silva TJ, Zambrano Gutiérrez MI. Inhibición del *streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. *Odontologia (Lima)* [Internet]. el 13 de noviembre de 2018;18(2):29–34. Disponible en: <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/odontologia/article/view/1334>
65. Mozibullah Md, Ahammad H, Tarin T, Islam MdJ, Khatun M, Islam MJ, et al. Evaluation of anti-oxidant and antibacterial activities of *Ixora chinensis* and *Cascabela thevetia* leaf extracts: An in vitro study. *J Pharmacogn Phytochem*. el 1 de enero de 2023;12(1):35–40.
66. Elchaghaby MA, Abd El-Kader SF, Aly MM. Bioactive composition and antibacterial activity of three herbal extracts (lemongrass, sage, and guava leaf) against oral bacteria: An in vitro study. *J Oral Biosci*. marzo de 2022;64(1):114–9.
67. Sindi A, Chawn MVB, Hernandez ME, Green K, Islam MK, Locher C, et al. Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):17666. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54217-8>
68. Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. el 25 de mayo de 2018;19(6):1578.

Anexo 1

Distribución de las muestras preparadas en la placa multiposos 8 x 12 con tabla de abreviaturas, la simbología estéril especifica que el extracto madre de la planta formo parte del experimento sin entrar en contacto con otra sustancia, esto fue realizado para garantizar la esterilidad del extracto y que *S. mutans* no interactuó con otro microorganismo.

Placa multiposos-Solvente-Alcohol												
x	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O 100%	O 100%	O 100%	O 50%	O 50%	O 50%	CE 100%	CE 100%	CE 100%	CE 50%	CE 50%	CE 50%
B	O 25%	O 25%	O 25%	O Estéril	O Estéril	O Estéril	CE 25%	CE 25%	CE 25%	CE Estéril	CE Estéril	CE Estéril
C	M 100%	M 100%	M 100%	M 50%	M 50%	M 50%	T 100%	T 100%	T 100%	T 50%	T 50%	T 50%
D	M 25%	M 25%	M 25%	M ST	M ST	M ST	T 25%	T 25%	T 25%	T Estéril	T Estéril	T Estéril
E	CL 100%	CL 100%	CL 100%	CL 50%	CL 50%	CL 50%	CA 100%	CA 100%	CA 100%	CA 50%	CA 50%	CA 50%
F	CL 25%	CL 25%	CL 25%	CL Estéril	CL Estéril	CL Estéril	CA 25%	CA 25%	CA 25%	CA Estéril	CA Estéril	CA Estéril
G	R 100%	R 100%	R 100%	R 50%	R 50%	R 50%	S 100%	S 100%	S 100%	S 50%	S 50%	S 50%
H	R 25%	R 25%	R 25%	R Estéril	R Estéril	R Estéril	S 25%	S 25%	S 25%	<i>S. Mutans</i>	<i>S. Mutans</i>	<i>S. Mutans</i>

Placa multiposos-Solvente-Agua												
x	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O 100%	O 100%	O 100%	O 50%	O 50%	O 50%	CE 100%	CE 100%	CE 100%	CE 50%	CE 50%	CE 50%
B	O 25%	O 25%	O 25%	O Estéril	O Estéril	O Estéril	CE 25%	CE 25%	CE 25%	CE Estéril	CE Estéril	CE Estéril
C	M 100%	M 100%	M 100%	M 50%	M 50%	M 50%	T 100%	T 100%	T 100%	T 50%	T 50%	T 50%
D	M 25%	M 25%	M 25%	M Estéril	M Estéril	M Estéril	T 25%	T 25%	T 25%	T Estéril	T Estéril	T Estéril
E	CL 100%	CL 100%	CL 100%	CL 50%	CL 50%	CL 50%	CA 100%	CA 100%	CA 100%	CA 50%	CA 50%	CA 50%
F	CL 25%	CL 25%	CL 25%	CL Estéril	CL Estéril	CL Estéril	CA 25%	CA 25%	CA 25%	CA Estéril	CA Estéril	CA Estéril
G	R 100%	R 100%	R 100%	R 50%	R 50%	R 50%						
H	R 25%	R 25%	R 25%	R Estéril	R Estéril	R Estéril	<i>S. Mutans</i>	<i>S. Mutans</i>	<i>S. Mutans</i>	Clorhexidina	Clorhexidina	Clorhexidina

O	=	Orégano
M	=	Manzanilla
Cl	=	Cilantro
R	=	Romero
CE	=	Cebolla
T	=	Thuja
CA	=	Canela
S	=	Solvente

Anexo 2

Resultados del experimento “Determinación de UFC” donde se expresa la media de 5 repeticiones en unidades Log de UFC/ ml.

Pruebas en alcohol		
	Tiempo Inicial	24 Horas
<i>S. Mutans</i>	6.94±0.1	8.13±0.32
Alcohol	6.94±0.1	5.08±0.05
Romero 100%	6.42±0.06	0
Canela 100%	5.63±0.42	0
Thuja 100%	6.65±0.16	0
Thuja 50%	5.48±0.08	0

Pruebas en agua		
	Tiempo Inicial	24 Horas
<i>S. Mutans</i>	6.77±0.2	7.17±0.36
Romero 100%	7.38±0.04	0
Romero 50%	5.55±0.14	5.66±0.25
Canela 100%	5.89±0.08	0
Canela 50%	7.13±0.21	6.09±0.31
Thuja 100%	6.14±0.21	4.68±0.27
Thuja 50%	6.15±0.31	4.99±0.07

Pruebas al 25%		
	Tiempo Inicial	24 Horas
<i>S. Mutans</i>	6.39±0.21	6.91±0.14
Alcohol	6.94±0.1	6.02±0.28
Romero 25%	6.76±0.09	7.16±0.18
Canela 25%	6.78±0.24	7.27±0.26
Thuja 25%	6.38±0.31	6.57±0.15