

**UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA**  
**SEDE QUITO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**CARRERA: BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del título de:**  
**Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales**

**TEMA:**

**Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de ishpingo (*Ocotea quixos*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).**

**AUTORA:**

**Teresa Melania Veloz Vera**

**DIRECTORA:**

**Ing. Tatiana Mosquera**

**Quito, Febrero 2011**

## **DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD**

Los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, febrero de 2011

---

*A mis padres Luis y Narcisa*

*A mis hermanos Luis Alejandro y Lorena*

*Gracias por su amor incondicional y por confiar en mí.*

## AGRADECIMIENTOS

No puedo dejar pasar esta oportunidad para agradecer, de todo corazón, a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para que este sueño personal se haga realidad:

- A Dios por el maravilloso don de la vida, por estar conmigo en todo momento, por fortalecer mi corazón y ayudarme a salir adelante a pesar de las dificultades.
- A la Universidad Politécnica Salesiana por el financiamiento de esta tesis.
- A mis padres: Luis y Narcisa, y mis hermanos: Luis Alejandro y Lorena, ya que son ellos quienes me acompañan y me apoyan durante todo el transcurso de mi vida, dándome ánimos y fortaleza cuando más lo necesito.
- A la Ing. Tatiana Mosquera, Directora de esta Tesis, por su entusiasmo, constante ayuda y orientación. Por ser además, mi ejemplo personal y profesional.
- A la Dra. María Elena Maldonado, por compartir desinteresadamente sus conocimientos, sobretodo en el área de Microbiología.
- Al Químico Paco Noriega, por su colaboración en la identificación química de los aceites esenciales de ishpingo así como en la cuantificación del mismo durante el estudio de estabilidad acelerada.
- Al Máster Patricio Yáñez, por su acertada asistencia y colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos.
- A Fundación Chankuap, por proveerme las muestras de aceites esenciales de ishpingo.
- A la Dirección del CIVABI, por facilitarme el uso de las instalaciones, materiales y equipos del laboratorio de Microbiología para el correcto desenvolvimiento de esta Tesis.
- A los ayudantes y colaboradores de los Laboratorios del CIVABI, por recibirme día a día durante este tiempo, por su gran voluntad y paciencia facilitándome materiales y equipos.
- A los/as estudiantes que formaron parte del panel sensorial, por su disponibilidad y apoyo en la prueba de perfil del producto elaborado.

- A mis amigos/as, por ser testigos y cómplices de las alegrías y tristezas, de buenos y malos momentos pero sobretodo, por levantarme el ánimo cuando las cosas no fueron como las esperaba.
- A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron para que esta Tesis llegue a su término.

Mil gracias a todos/as

## INDICE

CARÁTULA.....	i
DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE.....	vi
INTRODUCCION.....	vii
1. MARCO TEORICO.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
3. JUSTIFICACION.....	42
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS.....	44
5.1 General.....	44
5.2 Específicos.....	44
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	58
8. CONCLUSIONES.....	89
9. RECOMENDACIONES.....	90
10. FOTOGRAFÍAS.....	92
11. ANEXOS.....	96
12. BIBLIOGRAFÍA.....	125

## INTRODUCCIÓN

La caries, así como las infecciones de garganta, son algunas de las enfermedades más comunes en el mundo. Los microorganismos presentes en la placa dental o placa bacteriana están íntimamente relacionados a estas patologías, siendo *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* los agentes etiológicos que causan la caries y las infecciones de garganta respectivamente; por lo cual, el control de estos microorganismos es de mucha importancia para evitar la enfermedad y en la actualidad se lo realiza mediante el uso de productos tópicos o locales (enjuagues bucales y colutorios) que contienen sustancias antimicrobianas para eliminar la flora bacteriana de la placa dental.

En los últimos años, el uso de las plantas como fuente de principios activos antimicrobianos es de gran interés para los investigadores puesto que las ventajas son diversas: fácil acceso, bajo costo y sobretodo, pocos efectos colaterales indeseables.

La presente investigación pretende demostrar de una manera clara y sencilla la alternativa que se tiene en el uso de los aceites esenciales de ishpingo (*Ocotea quixos*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en la formulación de un colutorio (enjuague bucal) que inhiba el crecimiento de *S. mutans* y *S. pyogenes*.

Esta investigación se realizó con el objeto de determinar la eficacia in vitro del colutorio elaborado frente a cuatro enjuagues bucales comerciales (Listerine, Encident, Oraldine y Colgate Plax) mediante el método de difusión en medio sólido.

En una primera parte se abordan los aspectos teóricos más relevantes de la investigación así como la importancia y el por qué de la misma. Seguidamente se procede a describir los objetivos de la investigación y se describe detalladamente los materiales y métodos utilizados. A continuación se presentan los resultados y el análisis de éstos. Finalmente se exponen las conclusiones y recomendaciones a las que se llegaron con esta investigación.

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 LA PLACA DENTAL O PLACA BACTERIANA

#### 1.1.1 Introducción

Los seres humanos vivimos inmersos en un mundo de bacterias, se encuentran por todos lados y nuestro cuerpo no es la excepción. Pocas horas después del nacimiento, “somos colonizados por bacterias que vivirán con nosotros durante toda la vida, estas bacterias colonizan toda la piel, tracto digestivo, vías respiratorias altas, oídos, boca y algunos otros tejidos.”<sup>1</sup>

Sin embargo sabemos que algunas de estas bacterias con las que convivimos diariamente pueden representar un riesgo para nuestra salud, principalmente en las siguientes situaciones:

- Cuando crecen de forma anormalmente alta.
- Cuando existen bacterias en un sitio anormal al que les corresponde.
- Cuando existen bacterias en un sitio normalmente estéril.<sup>2</sup>

Por estas razones, nuestro cuerpo debe funcionar como un micro-ecosistema equilibrado en donde vivan simbióticamente un gran número de bacterias. Cuando este equilibrio se rompe, ya sea por alteración del ecosistema bacteriano normal o por factores del cuerpo humano que favorezcan la disminución de las defensas y que permitan que las bacterias normales invadan y ataquen a su huésped humano, estas bacterias representan un riesgo potencial. El número y el tipo de bacterias pueden ser modificados por factores como: la temperatura, la humedad y la presencia de nutrientes o de sustancias inhibitorias.<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup> ABOITIZ, Carlos, *Flora bacteriana normal*, [en línea], 02/04/ 2008, actualizado 11/11/2008, [citado 08/08/2010], Formato html, disponible en Internet: <http://www.doctoraboitiz.com/pediatria/36-articulos-de-pediatria/114-flora-bacteriana-normal.html>

<sup>2</sup> Ídem

<sup>3</sup> Ídem

### 1.1.2 La cavidad oral: hábitat de microorganismos

La cavidad oral, tomando en cuenta en ella a los dientes y las encías, es una de las regiones del cuerpo que posee la flora bacteriana más diversa y compleja.<sup>4</sup> La flora oral está compuesta por más de 300 especies de microorganismos pero no está completamente identificada.<sup>5</sup>

La boca está continuamente bañada por la saliva, manteniendo una temperatura de 35-36°C a un pH de 6,75 a 7,25, condiciones óptimas para el crecimiento de muchos microorganismos.<sup>6</sup>

En el momento del parto, la boca del neonato está exenta de microorganismos, es estéril, sin embargo, al establecerse un contacto con la madre, 8-12 horas después del nacimiento, una gran cantidad de microorganismos se incrementan rápidamente (lactobacilos, estreptococos, estafilococos, enterococos, coliformes, etc).<sup>7</sup> Durante la aparición de los primeros dientes, se incorporan a la flora bacteriana de la cavidad oral varios anaerobios mientras que, en la niñez las especies facultativas son predominantes. Conforme pasa el tiempo, las bacterias se incrementan de modo que en la última etapa de la niñez, esta flora bacteriana bucal se parece a la de los adultos. La variada flora de la boca puede ser resumida en la Tabla 1.

---

<sup>4</sup> GUERRA, Juan, *Microbiología bucal*, [en línea], Bolivia, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 08-08-2010], formato pdf, disponible en Internet: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa93020213.pdf>, p. 69.

<sup>5</sup> s/a, “Placa dentobacteriana”, *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, Vol 60, N° 1, México, Enero-Febrero 2003, pp 34-36

<sup>6</sup> Ídem, p. 35

<sup>7</sup> Ídem, p. 35

<b>Tabla 1. Flora normal de la cavidad bucal y su existencia</b>	
<b>Bacteria</b>	<b>Existencia</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Muy frecuente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Común
<i>Streptococcus mitis</i>	Muy frecuente
<i>Streptococcus salivarius</i>	Muy frecuente
<i>Streptococcus mutans</i>	Muy frecuente
<i>Streptococcus faecalis</i>	Común
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Común
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Común
<i>Neisseria meningitidis</i>	Muy frecuente
<i>Veillonella sp.</i>	Común
Coliformes ( <i>Escherichia coli</i> )	Común
<i>Proteus mirabilis</i>	Común
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ocasional o transitorio
<i>Haemophilus influenzae</i>	Común
<i>Bacteroides</i>	Común
Espiroquetas	Común
<i>Lactobacillus sp.</i>	Muy frecuente
Clostridios	Ocasional o transitorio
Corinebacterias	Común
Actinomicetos	Común
Micoplasmas	Común

Fuente: ABOITIZ, Carlos, *Flora bacteriana normal*, 2008

### **1.1.3 Placa dental: descripción general**

Durante años han existido varias definiciones expresadas por diferentes investigadores acerca del término placa dental. “La placa dental fue descrita por primera vez en 1898 por Black, como una masa microbiana que recubría las lesiones cariosas. En 1976, Bowen, define a la placa dental como depósitos blandos que

forman una biopelícula que se adhiere a la superficie dentaria o a otras superficies duras en la boca”<sup>8</sup>.

En la actualidad, Marsh y Martin (2000), “definen a la placa dental como una comunidad microbiana compleja que se encuentra en la superficie de los dientes, embebida en una matriz de origen bacteriano y salival”<sup>9</sup>. Esta matriz se forma por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), cumple con una función de protección de la comunidad bacteriana y facilita la comunicación entre los microorganismos por señales bioquímicas.

Siendo una comunidad pluricelular, la placa dental posee comportamientos similares a los de los organismos vivos individuales: nace, se desarrolla y se reproduce presentando diferenciación morfológica y funcional entre las células constituyentes así como complejos sistemas de comunicación dentro de la comunidad.

La placa dental también llamada placa bacteriana se puede definir como una “masa blanda, translúcida y muy adherente que se acumula sobre la superficie de los dientes, formada casi exclusivamente por bacterias y sus subproductos.”<sup>10</sup> La OMS la define como “una entidad bacteriana proliferante, enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria” (...) por tal motivo, no se elimina con un simple enjuague de agua.

Es importante tener presente la diferencia entre el concepto de placa dental y otros depósitos dentarios como la sustancia alba, “la cual es un depósito aparentemente igual a la placa bacteriana, pero fácilmente removible pues carece de la adherencia y organización que son características fundamentales de la placa”.<sup>11</sup>

---

<sup>8</sup>GUILARTE, C. y PERRONE, M. *Microorganismos de la placa dental relacionados con la Etiología de la Periodontitis*, [en línea], Venezuela, 2004, Acta odontológica Venezolana, Vol 42, N° 3, formato pdf, disponible en Internet:

[http://www.actaodontologica.com/ediciones/2004/3/microorganismos\\_placa\\_dental\\_etiologia\\_periodontitis.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/2004/3/microorganismos_placa_dental_etiologia_periodontitis.asp)

<sup>9</sup> Ídem

<sup>10</sup> CASTRO, Viviana, *Inhibición Del Crecimiento In Vitro De Streptococcus mutans por Papaina y Sanitrend*, [en línea], Santiago-Chile, 2005, [citado 12-06-2010], Tesis Universidad de Chile, Facultad de Odontología, formato pdf, disponible en: [http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/castro\\_v/sources/castro\\_v.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/castro_v/sources/castro_v.pdf), p.15

<sup>11</sup> LAHOUD, Víctor, *Placa Bacteriana*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 21-09-2010], Revista Odontológica,

#### 1.1.4 Formación de la placa dental

La placa dental, como se ha mencionado, está formada por un conjunto de microorganismos. Su desarrollo incluye un conjunto de complejos procesos:<sup>12</sup>

- Formación de la película adquirida sobre el esmalte
- Adhesión bacteriana a la película adquirida
- Colonización primaria
- Colonización secundaria
- Maduración de la placa

La primera fase en la formación de la placa dental es la formación de la cutícula dentaria o película dental adquirida (PDA), que ocurre a los pocos minutos de haber realizado un correcto cepillado dental. La PDA “se define como una capa acelular formada por proteínas salivales y otras macromoléculas, provenientes de desechos bacterianos, su espesor varía entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ ”<sup>13</sup> (...). La PDA funciona como una barrera de protección proporcionando “lubricación a las superficies impidiendo la desecación del tejido, además, posee moléculas que funcionan como sitios de unión para adherencia de microorganismos y enzimas de origen salival, lisosimas, amilasas y peroxidasa, que favorecen la colonización bacteriana sobre la superficie de la película”<sup>14</sup>

“La colonización bacteriana primaria ocurre mediante la adhesión irreversible y específica entre los receptores de la película adquirida y las moléculas bacterianas

---

U.N.M.S.M., formato pdf, disponible en Internet: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rev\\_cientifica/n04\\_1994/pdf/a06.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rev_cientifica/n04_1994/pdf/a06.pdf), p. 28-29

<sup>12</sup> LIÉBANA, José, *Estabilidad de genotipos de Streptococcus mutans en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-2*, [en línea], Granada, Editorial de la Universidad de Granada, 2008, [citado 24-10-2010], Tesis Universidad de Granada, Facultad de Odontología, formato pdf, disponible en Internet: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1836/1/17366768.pdf>, ISBN 978-84-338-4915-1, p. 25.

<sup>13</sup> LLENA-PUY, Carmen, “The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis”, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006; 11: E449-55. © Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946

<sup>14</sup> ARICAPA, Diana, *Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos*, [en línea], Bogotá, 2009, [citado 06-10-2010], Tesis Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Carrera de Bacteriología, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf>, p.52

conocidas como adhesinas, (...) esta etapa dura entre 4 y 24 horas y en ella predominan las bacterias de metabolismo aerobio.”<sup>15</sup>

“La colonización secundaria puede durar entre 1 y 14 días, a partir de este momento, predomina la multiplicación activa de bacterias por agregación y coagregación, aunque también pueden haber bacterias que se unan por adhesión. La placa aumenta de espesor y en las zonas más profundas comienzan a predominar los microorganismos anaerobios, se establecen fenómenos de competencia bacteriana y los nutrientes se obtienen a partir de la degradación de la matriz acelular y gracias a la excreción de determinados metabolitos bacterianos que pueden servir de nutrientes a otras especies.

Transcurridas dos semanas aproximadamente se forma la placa madura, en cuyas zonas más profundas escasean el oxígeno y los nutrientes y aumenta el acúmulo de productos de desecho, poniéndose en riesgo el número de células viables (...). La placa madura puede mineralizarse y formar el cálculo, cuya composición microbiana es similar a la de ésta, aunque tal vez con menor número de células viables. La formación del cálculo tiene como prerrequisito que la placa tenga un pH más alcalino que la saliva (...) La actividad de las proteasas en la saliva está íntimamente relacionada con los índices de cálculo, así mismo la alta concentración de urea en la placa favorece la deposición de calcio y fósforo en la misma. Sobre esta placa calcificada pueden volver a iniciarse procesos como los anteriormente descritos, lo que irá incrementando su espesor.<sup>16</sup>

Una característica importante de esta comunidad bacteriana que se establece en la cavidad bucal es el “mantenimiento de una microflora estable en un medio que es variable. Tal estabilidad ha sido denominada homeostasis microbiana”<sup>17</sup>.

“Esto no significa que no haya actividad metabólica alguna entre las poblaciones microbianas que constituyen la placa. Por el contrario, esta estabilidad es el resultado de un balance dinámico, sostenido por una serie de interacciones, tanto sinérgicas como antagónicas, entre los diferentes grupos microbianos. Estas interacciones incrementan el catabolismo de nutrientes endógenos (proteínas y glicoproteínas) y proveen protección de las presiones del medio, a través del mantenimiento de un medio local favorable aún durante las fluctuaciones desfavorables periódicas que puedan ocurrir en el microambiente. Estas interacciones permiten a los organismos, dentro de una comunidad, persistir y crecer sobre un hábitat más amplio y desplegar acciones sinérgicas en el reciclamiento de nutrientes, incrementando de esta forma la eficiencia metabólica dentro de la comunidad.

---

<sup>15</sup> LLENA, Carmen, Op. Cit., p. 453

<sup>16</sup> Ídem, p. 453

<sup>17</sup> PEREZ, Ada, “La Biopelícula: una nueva visión de la placa dental”, *Rev Estomatol Herediana*, 2005; 15(1): 82 - 85

De otro lado, las interacciones antagónicas entre los microorganismos son un factor que contribuyen a determinar la composición de las comunidades microbianas de la placa dental. La producción de compuestos antagónicos, tales como bacteriocinas<sup>18</sup>, o sustancias inhibidoras semejantes a las bacteriocinas, pueden proporcionar a un organismo determinado una ventaja competitiva cuando interacciona con otros.<sup>19</sup>

### 1.1.5 Clasificación de la placa dental

Existen varios criterios para clasificar a la placa dental. De acuerdo a sus propiedades la placa puede ser: adherente o poco adherente, por su capacidad patógena puede ser cariogénica o periodontopatogénica, sin embargo, la clasificación más utilizada es de acuerdo a su ubicación: supragingival o subgingival.<sup>20</sup>

“La placa dental supragingival se encuentra en las superficies dentales y está constituida predominantemente por flora bacteriana sacarolítica Gram positiva, en las cuales se encuentran microorganismos cariogénicos; sin embargo, es posible que esta placa se extienda hasta el fondo del surco gingival y entre en contacto con la encía, recibiendo la denominación de placa marginal. La placa dental subgingival se encuentra por completo dentro del surco gingival o de los sacos periodontales, y está constituida principalmente por flora bacteriana proteolítica Gram negativa en la cual se encuentran microorganismos periodontopatogénicos.”<sup>21</sup>

Tanto la placa supragingival y subgingival son importantes en la formación de sarro y caries dental, mientras que, la placa subgingival es importante en la destrucción del tejido blando en las diferentes formas de la periodontitis.

### 1.1.6 Acumulación de la placa bacteriana: causas y consecuencias

La acumulación de la placa bacteriana se debe principalmente a técnicas incorrectas de cepillado y hábitos higiénicos bucodentales inadecuados. Esta acumulación, es la responsable de varias patologías como:

- *Gingivitis*: Según la Academia Americana de Periodontología, se define como la inflamación de la encía. Es causada por la acumulación de placa

---

<sup>18</sup> Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos sintetizados en el ribosoma de algunas bacterias (por ejemplo las lácticas) que tienen actividad antibacteriana ante microorganismos relacionados o presentes en su ambiente.

<sup>19</sup> PÉREZ, Ada, Op. Cit., p. 84

<sup>20</sup> s/a, *Placa dentobacteriana*, Op. Cit., p. 34

<sup>21</sup> GUILARTE, C. y PERRONE, F., Op. Cit.

bacteriana alrededor del diente, en la encía, produciendo al inicio inflamación y posteriormente sangrado.

- *Enfermedad periodontal*: Una vez que se ha producido una gingivitis, si la placa bacteriana continúa en el diente sin ser removida por largo tiempo se endurecerá por acción de los minerales de la saliva y se convertirá en un cálculo dental. Si a continuación, éste sigue creciendo por mayor acumulación de la placa bacteriana, “comenzará a retraer la encía y el ligamento periodontal facilitando la caída del diente por pérdida de tejido de soporte. Esto se llama enfermedad periodontal y se puede clasificar de acuerdo a su severidad.”<sup>22</sup>
- *Sarro*: Si la acumulación de la placa no es controlada mediante la higiene bucal diaria, al cabo de un tiempo se endurece por acción de los minerales y se transforma en sarro dental. Al sarro también se lo denomina cálculo dental o tártaro.
- *Halitosis*: Es el término usado para describir el aliento desagradable. La principal causa de la halitosis, “es la putrefacción de sustratos proteicos, principalmente, por parte de los microorganismos gramnegativos”<sup>23</sup> presentes en la boca. “Esto genera compuestos sulfúricos volátiles, que son responsables de la halitosis.”<sup>24</sup>
- *Caries*: “La caries es una enfermedad infecciosa caracterizada por la destrucción del tejido dentario por efecto de los ácidos que producen las bacterias en presencia de alimentos azucarados y almidones. Esta enfermedad puede ir desde una pequeña mancha blanca, que es el estadio inicial de la caries, hasta la destrucción total del diente y la diseminación de la infección hacia otras partes del cuerpo.”<sup>25</sup>

---

<sup>22</sup> AIEPI, *Módulo Salud Oral*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 14-04-2010], Organización Panamericana de la Salud, formato pdf, disponible en Internet: <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/si-oral1.pdf>, p. 9

<sup>23</sup> VELAZQUES, María Eugenia y GONZÁLEZ, Olga, “La Halitosis. Definición, clasificación y factores etiológicos”, *Acta Odontológica Venezolana*, Vol 44, N° 2, Venezuela, 2006

<sup>24</sup> Ídem

<sup>25</sup> AIEPI, Op. Cit. p. 9

### 1.1.7 Composición microbiológica de la placa

“La placa bacteriana está constituida en un 70% de su volumen por microorganismos y el 30% restante, por elementos microbianos”<sup>26</sup>, tales como: mucina salival, residuos alimenticios y células descamadas de la cavidad bucal.<sup>27</sup> La composición microbiana de la placa es muy variable y se modifica en función de la localización (supragingival o subgingival), el medio externo, la vida de la placa y la edad del individuo. Los microorganismos que forman la placa dental son diversos, “se pueden encontrar entre 200 y 300 especies”<sup>28</sup>.

La identificación de los microorganismos de la placa se basa en el análisis de su morfología, tinción Gram y análisis bioquímicos.<sup>29</sup>

En general, la placa bacteriana supragingival madura (la más común) esta compuesta en un 50% por cocos, un 48% por bacilos, un 1% por treponemas orales y el 1% restante por otros microorganismos.<sup>30</sup>

En la Tabla 2, se presentan los microorganismos más importantes presentes en la placa bacteriana supragingival madura.

---

<sup>26</sup> LAHOUD, Víctor, Op. Cit., p. 28

<sup>27</sup> Ídem, p. 28

<sup>28</sup> SUÁREZ, Susana, *Composición microbiana de las placas dentales*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 16-05-2010], formato html, disponible en Internet: <http://microral.wikispaces.com/Microbiolog%C3%ADa+de+las+placas+bacterianas+dentales>.

<sup>29</sup> LAHOUD, Víctor, Op. Cit., p. 28

<sup>30</sup> SUÁREZ, Susana, Op. Cit.

<b>Tabla 2. Microorganismos presentes en la placa supragingival madura</b>			
TIPO	COCOS	BACILOS	DIVERSOS MICROORGANISMOS
			<i>Mycoplasma spp</i> <i>Candida spp</i> <i>Trichomonas tenax</i> <i>Entamoeba gingivalis</i>
Gram (+) anaerobios facultativos	<i>Streptococcus spp</i> <i>Enterococcus spp</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Staphylococcus spp</i>	<i>Actinomyces spp.</i> ( <i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i> ) <i>Corynebacterium spp</i>	
Gram (+) anaerobios estrictos	<i>Peptostreptococcus spp</i>	<i>Eubacterium spp</i>	
Gram (-) preferentemente aerobios	<i>Neisseria spp.</i>		
Gram (-) anaerobios facultativos	<i>Veillonella spp.</i>	<i>Haemophilus spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i> <i>Eikenella spp.</i>	
Gram (-) aerobios estrictos		<i>Fusobacterium spp.</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>Selenomonas spp</i>	

Fuente: SUAREZ, Susana, *Composición microbiana de las placas dentales*, fecha de publicación desconocida

Otros microorganismos importantes son: *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* y *S. oralis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. parasanguis*, *Neisseria spp.*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y otros.<sup>31</sup>

<sup>31</sup> SUAREZ, Susana, Op. Cit.

### **1.1.8 Microorganismos seleccionados para la investigación**

Para la realización de esta tesis se han escogido a dos microorganismos: *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*. La selección de estos microorganismos se ha basado en la importancia que éstos tienen en la producción de algunas enfermedades comunes en la población como: la caries (producida por *S. mutans*) y la faringoamigdalitis (producida por *S. pyogenes*).

#### **1.1.8.1 *Streptococcus mutans*: antecedentes y características generales.**

La caries es el “padecimiento de mayor prevalencia y costo en el mundo, ya que se calcula que es de un 70% en la población mundial. Sin embargo, esta prevalencia es mucho mayor en los países menos desarrollados y con mayor índice de pobreza.”<sup>32</sup>

En los países industrializados, la caries dental es considerada como uno de los mayores problemas de salud oral, “llegando a afectar entre 60% y 90% de la población escolar y adulta.”<sup>33</sup> Investigaciones realizadas a “principios de la década de 1990 en algunos países Latinoamericanos como República Dominicana, Argentina, Venezuela y Ecuador, informan que entre 85% y 97% de la población presentaba esta enfermedad.”<sup>34</sup>

La aparición de la caries dental está mediada por complejos mecanismos que son iniciados por algunos factores como: genéticos, conductuales (sobre todo la dieta), ambientales y microbianos. “En el caso de los factores microbianos, la presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones de caries, sin bacterias no hay lesión.”<sup>35</sup>

Existen un sinnúmero de microorganismos que producen caries, a estos microorganismos se les denomina cariogénicos, sin embargo, “*Streptococcus mutans*

---

<sup>32</sup> PORTILLA, J. y col., “Conceptos actuales e investigaciones futuras en el tratamiento de la caries dental y control de la placa bacteriana”, *Revista Odontológica Mexicana*, Vol 14, N° 4, México, Diciembre 2010, pp 218-225.

<sup>33</sup> ARICAPA, Diana, Op. Cit., p. 20

<sup>34</sup> Ídem, p. 20

<sup>35</sup> FIGUEROA-GORDÓN, M, ALONSO, G y ACEVEDO, A, “Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental”, *Acta Odontológica Venezolana*, Vol 47, N° 1, Venezuela, 2009, ISSN: 0001-6365, pp 1-13.

ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental”<sup>36</sup>, por tal razón, se ha escogido a este microorganismo para la realización de esta investigación.

*Streptococcus mutans* es una bacteria cococá, Gram positiva, microaerófila. Para poder crecer y desarrollarse “in vitro” necesita de medios enriquecidos y un ambiente con baja tensión de oxígeno, sus células se disponen en cadenas.

El papel de *Streptococcus mutans*, en la iniciación y progresión de la caries dental ha sido ampliamente estudiado. Algunas características fenotípicas de estas bacterias son determinantes en su cariogenicidad. Su capacidad de virulencia está asociada a varios factores, como son:<sup>37</sup>

- Su poder acidogénico, ya que metaboliza hidratos de carbono a ácidos
- Su poder acidófilico, pues es capaz de crecer a pH 5.2, y
- Su carácter acidúrico, ya que puede mantenerse metabólicamente activo a pesar de un pH bajo

Es importante destacar que no todas las cepas de *S. mutans* poseen estas características y que unas son más patógenas que otras. Las propiedades de patogenicidad de algunas de estas especies, permiten su adaptación y crecimiento sobre el esmalte y así la colonización del diente. En esta etapa influyen, también factores exógenos como el excesivo consumo de sacarosa en la dieta. Para que *Streptococcus mutans* se disemine entre las superficies dentarias debe estar presente en cantidad suficiente en la saliva, para poder vencer a la colonización de la microbiota bucal normal.<sup>38</sup>

La habilidad de *Streptococcus mutans* para formar la placa bacteriana, está relacionada con la producción de glucosiltransferasas, enzimas que tienen un rol principal en las interacciones adhesivas y expresión de virulencia de estos microorganismos debido a que, catalizan la síntesis de polisacáridos extracelulares (glucanos solubles e insolubles en agua) que promueven la adhesión de estreptococos cariogénicos a la superficie del diente. Dichas enzimas proporcionan a la célula un sustrato de donde obtener energía y

---

<sup>36</sup> CASTRO, Viviana, Op. Cit., p. 16

<sup>37</sup> Ídem, p. 16-17

<sup>38</sup> Ídem, p. 17

mantener la producción de ácido durante largos periodos de tiempo. A partir del metabolismo de la sacarosa estos microorganismos producen principalmente ácido láctico, el cual es fundamental en la virulencia debido a que, aparentemente, es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente.<sup>39</sup>

### 1.1.8.2 *Streptococcus pyogenes*: antecedentes y características generales

El estreptococo beta hemolítico del grupo A es conocido también como *Streptococcus pyogenes* y “es uno de los patógenos bacterianos de mayor importancia en el ser humano.”<sup>40</sup> Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, crece en pares o en cadenas en medio líquido, inmóviles, capsulados, requieren medio nutricionalmente rico y una baja tensión de oxígeno para crecer, son catalasa negativa y sensibles a la bacitracina. El rango de temperatura de su crecimiento varía entre 25 a 45°C siendo 37°C la temperatura óptima.<sup>41 42</sup>

*S. pyogenes* es parte de la flora normal de la cavidad bucal sin embargo, es el causante del 15-30%, de las faringoamigdalitis (FAA) bacterianas.<sup>43</sup> La FAA es una enfermedad que se caracteriza ser un proceso agudo febril con inflamación de las membranas mucosas y estructuras subyacentes de la nasofaringe y amígdalas, evidenciándose eritema, exudados y ulceraciones.<sup>44</sup> “El término faringitis es otra variante semántica intercambiable, si bien debe reservarse a la infección primaria de la faringe.”<sup>45</sup> “Raramente otras bacterias pueden dar faringitis: estreptococos β-

---

<sup>39</sup>CASTRO, Viviana, Op. Cit., p. 17

<sup>40</sup> GORDILLO, R y otros, “Sensibilidad de aislamientos faríngeos de *Streptococcus pyogenes* en la provincia de Córdoba (España)”, Prous Science S.A.-Sociedad española de Quimioterapia, *Rev Esp Quimioterapia*, Vol 16, N°1, España, Marzo 2003.

<sup>41</sup> RIVERA, Maribel, “Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*)”, *Honduras Pediátrica*, Volumen XIX, N°2, Honduras, Abril, Mayo, Junio 1998, pp 47-51

<sup>42</sup> AÑANCA, Erick, *Efecto antibacteriano invitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes**, [en línea], Perú, 2009, [citado 29-10-2010], Tesis Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias Médicas, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.unjbg.edu.pe/tesis/pdf/tesis11.pdf>, p. 25.

<sup>43</sup> MONTEQUI, S y SANTOS, J.C, “Infecciones bacterianas de vías altas: Otitis, amigdalitis”, *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*, Vol 46, Suplemento 2, España, 2006, pp 294-303.

<sup>44</sup> RUIZ, Carmen, *Prevalencia de *Streptococcus beta hemolítico del grupo A*, en niños con faringoamigdalitis aguda bacteriana y niños sanos*, [en línea], Guatemala, Enero 2003, [citado 29-10-2010], Tesis Universidad Francisco Marroquín, Facultad de Medicina, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.tesis.ufm.edu.gt/pdf/3538.pdf>, p. 8

<sup>45</sup> Ídem, p. 294

hemolíticos grupo C y G, anaerobios, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae*.”<sup>46</sup>

La FAA ocurre principalmente en niños y adolescentes de edad escolar (5-15 años), con una gran incidencia en los primeros años escolares. Es importante recalcar que todas las edades son susceptibles a esta enfermedad y no existe ningún tipo de predilección por el sexo.<sup>47</sup>

La incidencia de FAA es mayor en climas templados y fríos debido al contacto cercano entre las personas. La transmisión del agente causante, *S. pyogenes*, es mayor durante la fase aguda (3-5 días) sin tratamiento y disminuye durante la etapa de colonización. Durante la fase aguda de la FAA, el *S. pyogenes* se encuentra en grandes cantidades en la nariz y garganta y si no existe un tratamiento adecuado, este microorganismo persiste durante algunas semanas pese a que desaparecen los síntomas y signos en pocos días.<sup>48</sup>

En el tratamiento de la FAA, la penicilina es el agente elegido prioritariamente. La amoxicilina es una alternativa con eficacia semejante.<sup>49</sup>

Las complicaciones por FAA son poco frecuentes (1%) y pueden ser:

- *Complicaciones locales:* flemón amigdalino, absceso retrofaríngeo, adenitis cervical supurada, otitis media aguda, mastoiditis, sinusitis, celulitis cervical.
- *Complicaciones generales o post–estreptocócicas:* fiebre reumática y glomerulonefritis aguda; son extremadamente infrecuentes en el adulto.

---

<sup>46</sup> SAVIO, Eduardo y otros, *Guías de Tratamiento Infecciones Respiratorias*, [en línea], Montevideo, UDELAR, Agosto 2005, [citado 22-08-2010], formato pdf, disponible en Internet: [http://www.clinfec.fmed.edu.uy/pautas/pdfs/GuiaTToIR205\\_1.pdf](http://www.clinfec.fmed.edu.uy/pautas/pdfs/GuiaTToIR205_1.pdf), ISSN 1510-9380, pp 1-19

<sup>47</sup> RUIZ, Carmen, Op. Cit. p. 9

<sup>48</sup> Ídem, p. 9

<sup>49</sup> SAVIO, Eduardo y otros, Op. Cit., p.7

### 1.1.9 Control de la placa bacteriana

“El control de la placa bacteriana es la eliminación de la placa en forma regular y la prevención de su acumulación sobre los dientes y superficies (...) adyacentes (...)”.<sup>50</sup>

Esta se logra mediante métodos: mecánicos y químicos.

El método mecánico se basa en la remoción de la placa por medio del cepillado, la limpieza interdental (mediante el uso de la seda, hilo dental o palillos de dientes) y el raspaje y alisado radicular (realizado por el odontólogo con instrumentos apropiados). Una desventaja de estos métodos es que requieren tiempo, motivación y destreza manual por lo tanto, pueden no ser suficientes para controlar la placa.<sup>51</sup>

Por su parte, “el método químico para el control de la placa se dirige a la utilización de sustancias antisépticas y/o antibióticas que permiten reducir o retardar la formación de la placa bacteriana (...)”<sup>52</sup>. Estas sustancias actúan por medio de varios mecanismos como:<sup>53</sup>

- Evitando la adherencia bacteriana (mediante el empleo de agentes antiadhesivos)
- Retardando la proliferación bacteriana con sustancias bacteriostáticas.
- Extrayendo la placa establecida mediante lo que se conoce como "cepillo dental químico".
- Alterando la patogenicidad de la placa.

Ahora bien, el control químico de la placa, como ya se ha mencionado, está dado por diversas sustancias que son utilizadas como enjuagues bucales. Las sustancias más utilizadas son.<sup>54</sup>

---

<sup>50</sup> PLATT, Cristina, y otros, *Uso de los diferentes agentes químicos para el control de la placa bacteriana como coadyuvantes en la prevención de las enfermedades gingivales*, [en línea], Venezuela, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 27-05-2010], ODOUS Científica, Revista de la Facultad de Odontología, Universidad de Carabobo, formato pdf, disponible en Internet: <http://servicio.cid.uc.edu.ve/odontologia/revista/v5n1/5-1-2.pdf>, p.2.

<sup>51</sup> Ídem, p. 3

<sup>52</sup> Ídem, p. 3

<sup>53</sup> Ídem, p. 4

<sup>54</sup> Ídem, p. 4

1. Los compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio)
2. Fenoles (triclosán) y aceites esenciales<sup>55</sup>.
3. Productos naturales (sanguinarina)
4. Bisguanidas (digluconato de clorhexidina)

## 1.2 LOS ENJUAGUES BUCALES

### 1.2.1 Descripción general y tipos

Los enjuagues bucales son soluciones que se emplean después del cepillado dental, con el fin de eliminar la placa bacteriana.<sup>56</sup> Usando una definición más técnica, podemos decir que los enjuagues bucales “son soluciones acuosas o hidroalcohólicas que se aplican sobre las mucosas de la cavidad bucal. Se utilizan para limpiar y refrescar dicha cavidad.”<sup>57</sup>

Los enjuagues bucales pueden ser clasificados según su contenido de alcohol, entonces tenemos<sup>58</sup>:

- *Ausencia de alcohol*: Son soluciones acuosas generalmente de flúor utilizadas principalmente como aporte suplementario de flúor para prevención de la caries.
- *Colutorios*: Su contenido en alcohol es nulo o inferior al 20%. Se utilizan sin diluir.
- *Elixires*: Su contenido en alcohol es superior al 50%. Se administran diluidos en agua.

---

<sup>55</sup> Entiéndase en este punto como aceites esenciales únicamente a los monoterpenos cíclicos y acíclicos mas no a “las mezclas volátiles, de naturaleza compleja” elaboradas por las plantas.

<sup>56</sup> GUADRÓN, José, *Efecto sobre la placa bacteriana de los antisépticos bucales*, [en línea], El Salvador, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer, Facultad de Cirugía Dental, 2007, [citado 22-05-2010], formato pdf, disponible en Internet: <http://www.usam.edu.sv/SiteUmasferrer/InvestigacionInstitucional/Enjuagues%20bucales.pdf>, p. 4

<sup>57</sup> MUÑOZ, María José, *Higiene bucodental. Pastas dentríficas y enjuagues bucales*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 19-05-2010], Dermofarmacia, formato pdf, disponible en Internet: [http://www.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=15465&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=04v19n03a03008pdf001.pdf&ty=75&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://www.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=15465&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=04v19n03a03008pdf001.pdf&ty=75&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es), p. 5

<sup>58</sup> Ídem, p. 5

### 1.2.2 Composición

Los enjuagues bucales tienen prácticamente la misma composición que las pastas dentífricas, aunque no llevan sustancias abrasivas.<sup>59</sup> Los componentes más importantes de un enjuague bucal y su función, según María José Sánchez son:

- *Detergentes o espumantes:* Son agentes tensioactivos cuya función es disminuir la tensión superficial, solubilizar los depósitos existentes sobre los dientes y facilitar la dispersión de los agentes activos del dentífrico. Los más usados son: Lauryl sulfato de sodio, N-Lauryl sarcosinato de sodio (Gardol), Cocomonoglicerido sulfanato de sodio. Se usan en concentraciones que van del 1-3%.
- *Humectantes:* Evitan que las mucosas bucales se resequen con el uso del producto. Se usan principalmente: glicerina, sorbitol, polietilenglicol y propilenglicol en concentraciones que van del 10-30%.
- *Aromatizantes:* Utilizados para que el consumidor tenga la sensación de frescura en la boca luego del uso del producto. Por ejemplo: mentol, timol, eucaliptol, esencias de menta, canela, fresa y otros.
- *Edulcorantes:* Útiles para proporcionar un sabor dulce al enjuague. Se usa: sacarina, xilitol y ciclamatos en concentraciones del 1-2%.
- *Colorantes:* Necesarios para proporcionar características organolépticas agradables a la vista para el consumidor. Se usan los mismos colorantes usados en la industria alimenticia.
- *Conservantes:* Son imprescindibles sobretodo si el enjuague carece de alcohol. Principalmente se usan: benzoatos y parabenos en concentraciones del 0.1 al 0.5%.
- *Principios activos:* Aquellos que ejercen algún efecto terapéutico como:
  - *Sustancias antiplaca o antibacterianas:* Son agentes que eliminan los microorganismos presentes en la placa. Los más usados son: digluconato de clorhexidina, triclosán, hexetidina, fluoruros (fluoruro de estaño), aceites esenciales (timol, eucaliptol, mentol).

---

<sup>59</sup> MUÑOZ, María José, Op. Cit., p. 5

- *Sustancias que aumentan la resistencia del esmalte dental:* Útil para prevenir la caries, son sustancias que contienen flúor. Los principales compuestos fluorados son: Fluoruro sódico, Mono flúor fosfato de sodio, Fluorhidrato de Nicometanol (fluorinol), Fluoruro de estaño, Flúor de aminas, Fluoruro potásico.
- *Sustancias desensibilizantes:* Para combatir la sensibilidad dental a los cambios térmicos o a los ácidos. Las principales sustancias desensibilizantes son: nitrato de potasio, flúor, cloruro de estroncio, oxalato férrico, lactato de aluminio, citrato sódico dibásico.
- *Sustancias blanqueadoras:* Para aclarar el color de los dientes. Las sustancias más usadas son: peróxido de carbamida, bicarbonato sódico micropulverizado, trifosfato pentasódico, citroxaina, odontoblastina.
- *Sustancias antiinflamatorias:* Para combatir procesos inflamatorios de las encías y regenerar las mucosas. Las más utilizadas son: alantoína, aldioxa, provitamina B5 (pantenol), ácido hialurónico, enoxolona, vitamina E.
- *Enzimas:* Actúan sobre el metabolismo de la placa en casos de resequedad bucal, restableciendo el equilibrio bacteriano. Las más usadas son: Glucosa oxidasa, Amiloglucosa oxidasa, Lactoperoxidasa, Glucolactoperoxidasa.
- *Sustancias portadoras de calcio:* Se usa el glicerofosfato cálcico.
- *Sustancias naturales:* Pueden tener uno o varios de los efectos mencionados anteriormente. Se usan extractos de plantas, entre los más conocidos están los extractos de manzanilla, berenjena, clavo de olor, tomillo, salvia, mirra, menta y otros.

### 1.2.3 Método de elaboración

Los enjuagues bucales son soluciones. Se entiende por solución a la “mezcla, química y físicamente homogénea, de dos o más sustancias”<sup>60</sup>. Las soluciones son las formas farmacéuticas más simples y de uso frecuente en la actualidad.

---

<sup>60</sup> CUMBREÑO, Soledad y PÉREZ, Francisco, *Procedimientos Normalizados De Trabajo– Pn/L/Ff/007/00*, Offarm, Vol 23, Nº 9, Octubre 2004, pp 156-158.

Principalmente son formulaciones de antisépticos tópicos (enjuagues bucales) y productos dermatológicos (queratolíticos, corticoides, antibióticos antiacné, etc).<sup>61</sup>

El método de elaboración de estos productos propuesto por Soledad Cumbreño se resume en los siguientes pasos:

- Pesar o medir todos los componentes de la fórmula.
- Reunir las  $\frac{3}{4}$  partes del disolvente con el o los principios activos y agitar hasta que se disuelvan completamente. “La velocidad de disolución del principio activo puede aumentar calentando, siempre que este aumento de temperatura no afecte a la estabilidad del producto”<sup>62</sup> o de los principios activos. Si el o los principios activos son termolábiles, añadirlos y disolverlos en frío. Si el o los principios activos son insolubles en el disolvente, disolverlos previamente en un disolvente adecuado.
- Añadir lentamente los componentes minoritarios (conservantes, colorantes, saborizantes por ejemplo) y agitar hasta su completa disolución.
- Adicionar lentamente (si la fórmula lo describe) y con agitación constante, los espesantes. Mezclar hasta que se obtenga una solución homogénea.
- En caso de ser necesario, filtrar la solución.
- Completar la solución (con el resto del disolvente) hasta el volumen total especificado en la fórmula.
- Proceder al acondicionamiento en el envase adecuado (compatible con la solución que contiene, atendiendo a las especificaciones).
- Realizar los controles de calidad respectivos: organolépticos, físico-químicos, microbiológicos.

#### **1.2.4 Marcas más usadas y su composición**

En este punto se procederá a describir las características de los enjuagues bucales que serán utilizados como muestras en esta investigación. La información que se presenta, es la descrita en las etiquetas de cada producto.

---

<sup>61</sup> CUMBREÑO, Soledad y PÉREZ, Francisco, Op. Cit., p. 156

<sup>62</sup> Ídem, p. 158

### 1.2.4.1 Colgate Plax Menta Fresh Mint

Colgate Plax® proporciona una protección prolongada y una duradera sensación de limpieza y frescura en su boca. Su fórmula exclusiva con triclosán y fluoruro de sodio ayuda a formar una barrera protectora que continuamente ayuda a reducir la formación de placa bacteriana y el mal aliento. Además, Colgate Plax® proporciona protección a los dientes y las encías entre cepilladas por 12 horas. Con su fórmula odontológicamente comprobada, Colgate Plax® ayuda a fortalecer sus dientes, proporcionando una mayor protección anticaries.

**Instrucciones de uso:** Use Colgate Plax® antes o después de cepillar sus dientes, al menos dos veces al día. Llene la tapa con Colgate Plax®. No adicione agua. Enjuague la boca durante 60 segundos y después elimine el producto de la boca.

**Advertencias:** No tragar. Manténgase fuera del alcance de los niños. No debe ser usado por niños menores de 6 años. Si observa alguna reacción desfavorable, suspenda su uso.

**Fabricante:** Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda. Brasil.

**Ingredientes:** Fluoruro de sodio (0.05% o 225 ppm de flúor), triclosán (0.03%), Gantrez<sup>63</sup> (0.20%), agua, sorbitol, alcohol etílico, glicerina, lauril sulfato de sodio, metilcocoil taurato de sodio, copolímero PVM/MA, sabor, fosfato disódico, fluoruro de sodio, hidróxido de sodio, triclosano, sacarina sódica, D&C amarillo 10 (CI47005), FD&C azul 1 (CI42090).

El triclosán usado como principio activo en este enjuague bucal es un derivado del fenol y ha sido incluido recientemente en los enjuagues bucales y las cremas dentales.

Es incoloro y cristalino y tienen un amplio espectro de eficacia contra las bacterias Grampositivas y Gram-negativas. También es efectivo contra las

---

<sup>63</sup> El Gantrez es un copolímero entre metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) y se ha descrito su uso en la industria farmacéutica como espesante, estabilizante de soluciones acuosas, componente de adhesivos dentales, parches transdérmicos y excipientes en comprimidos bucales.

microbacterias, bacterias estrictamente anaeróbicas, esporas y hongos. Su mecanismo de acción se da en la membrana citoplasmática microbiana, induciendo un escape de las sustancias celulares y de esta manera, causando una bacteriólisis. Su toxicidad es baja y es altamente liposoluble.<sup>64</sup>

Solo como colutorio al 0,2% tiene un efecto inhibitorio moderado de la placa y una sustentividad<sup>65</sup> antimicrobiana de alrededor cinco horas. Su acción se ve reforzada por el agregado de citrato de zinc o por el copolímero éter polivinilmetacrílico del ácido maleico. Más que beneficios en el control de placa, el triclosan parece tener importancia en control de la gingivitis al tener un papel antiinflamatorio.(...) Tiene un control antiplaca similar al fluoruro sódico pero muy inferior a clorhexidina 0,12% (Addy, 1990). No se han observado efectos adversos importantes con esta sustancia.<sup>66</sup>

#### **1.2.4.2 Encident**

El enjuague Encident, es la fórmula más efectiva para eliminar en forma prolongada las bacterias que causan la caries, el mal aliento, enfermedades periodontales como la gingivitis, periodontitis y otras infecciones de la orofaringe, manteniendo las encías sanas. Su sabor agradable a menta deja su boca fresca y saludable.

**Instrucciones de uso:** Llene el dosificador de la tapa y enjuague su boca mínimo por un minuto, luego deseche.

**Advertencias:** No lo ingiera. Temperaturas bajas pueden cambiar la apariencia de este producto sin afectar sus propiedades y efecto. Consulte a su odontólogo para tratamientos específicos y/o prolongados.

**Fabricante:** Blenastor C.A. Quito-Ecuador.

**Ingredientes:** gluconato de clorhexidina (0.12%), fluoruro de sodio (0,10%).

La clorhexidina es sin duda el antiséptico de elección. Su utilización es amplia y es el agente más efectivo. La reducción de placa y de gingivitis alcanza el 60%. Su mecanismo de acción se realiza mediante una reducción

---

<sup>64</sup> PLATT, Cristina, y otros, Op. Cit., p.5

<sup>65</sup> La sustentividad se define como la habilidad de un agente de unirse a las superficies titulares y de liberar a través del tiempo, en dosis adecuadas, su principal ingrediente activo.

<sup>66</sup> BASCONES, A y MORANTE, S, "Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual", *Avances en periodoncia*, Vol 18, Nº 1, España, Abril 2006, pp 31-59.

de la formación de la película adquirida y alteración del desarrollo bacteriano y de la inserción al diente. Se presenta de tres formas: digluconato, acetato e hidrocloreto, la mayoría de productos usan el digluconato en concentrados del 20% o 12%. (...) El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente el desarrollo de gingivitis. (...) A bajas concentraciones tiene efecto bacteriostático, a altas concentraciones es bactericida debido a la precipitación o coagulación del citoplasma. La clorhexidina adsorbida gradualmente se libera durante veinticuatro horas, aunque la concentración en la boca disminuye. Por ello reduce la colonización bacteriana de las superficies dentarias. (...) Su efecto adverso más común es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas sobre todo del dorso de la lengua. La discoloración de las superficies de los dientes, lengua y mucosa oral es un efecto colateral bien conocido de los productos que contienen clorhexidina. Estas discoloraciones se piensa que pueden estar originadas por la interacción entre las sales de clorhexidina en la boca y los taninos presentes en algunos alimentos (té, vino, etc...) aunque tampoco puede descartarse la concentración y la dosis. (...) Otro efecto secundario descrito frecuentemente es la alteración del gusto.<sup>67</sup>

#### **1.2.4.3 Listerine**

Enjuague bucal. Ayuda en la higiene oral, en la prevención y reducción de la placa bacteriana, así como de la gingivitis. Combate los gérmenes que causan el mal aliento, la placa y la inflamación de las encías (gingivitis).

**Instrucciones de uso:** Enjuague la boca con 20 ml durante 30 segundos, sin diluir, 2 veces al día, después del cepillado.

**Advertencias:** Hipersensibilidad a los componentes. No administrar a niños menores de 12 años. No ingerir. Si observa alguna reacción desfavorable, suspenda su uso y consulte al odontólogo. El clima frío puede cambiar su apariencia, sin alterar su efecto. Mantenga alejado de los niños. Almacene a temperatura ambiente. No exceda de 30°C. Consulte a su odontólogo anualmente.

**Fabricante:** McNeil LA LLC, Cali-Colombia

---

<sup>67</sup> BASCONES, A y MORANTE, S. Op. Cit. p. 37-41.

**Ingredientes:** agua, alcohol 28.4%, ácido benzoico, eucaliptol, timol, mentol, metil salicilato, benzoato de sodio, caramelo, Poloxamer 407.

Los fenoles y aceites esenciales han sido utilizados en colutorios y caramelos durante años, aunque no tan eficaces como la clorhexidina. Tienen una actividad antiplaca avalada por una cantidad de estudios a corto y largo plazo de uso en el hogar. Lindhe (2000). (...) El producto comercial característico de este grupo es el Listerine. Su mecanismo de acción se relaciona a la ruptura de la pared celular e inhibición de la enzima bacteriana. Sus principales efectos adversos son la sensación de quemadura y gusto amargo. Comentan Ocampo y col. (2000) que puede producir una reducción entre 20 y 34% de la placa.<sup>68</sup>

Entre sus efectos adversos podemos destacar su fuerte sabor, que la casa comercial justifica diciendo que al ser un producto norte americano es más fuerte porque a los americanos les gustan los sabores fuertes y de acuerdo a Pontefract y cols. en 2001 tiene un ligero poder erosivo sobre el esmalte. De acuerdo a Addy y cols. 1995 el Listerine® tiñe los dientes en combinación con una ingesta abundante de te, en su estudio, en el que los pacientes bebían cinco tazas de te al día (...) lo que es un factor a tener en cuenta a la hora de usar este producto a largo plazo (...) Otros efectos secundarios observados han sido: (...) el sabor amargo y la sensación de quemazón en la cavidad oral.<sup>69</sup>

#### **1.2.4.4 Oraldine**

Tópico bucal. Antiséptico bucofaríngeo. Efecto coadyuvante en el tratamiento de la estomatitis ulcerosa y micótica. Reduce los síntomas y se observa un incremento de la cicatrización en lesiones orales quirúrgicas, traumáticas e infecciosas.

**Instrucciones de uso:** Haga gargarismos con 15 ml (una cucharada) de Oraldine sin diluir durante 30 segundos. Repita 2 o 3 veces al día. No exceda la dosis recomendada.

**Advertencias:** Si esta embarazada o en periodo de lactancia consulte al médico antes de usar este producto. Evítese el contacto con los ojos, si esto sucede con abundante agua fresca. Manténgase fuera del alcance de los niños. No ingerir. Consérvese el frasco bien cerrado a temperatura ambiente.

---

<sup>68</sup> PLATT, Cristina, y otros, Op. Cit., p. 5.

<sup>69</sup> BASCONES, A y MORANTE, S. Op. Cit. p. 35

**Fabricante:** McNeil LA LLC- Cali, Colombia.

**Ingredientes:** Cada 100 ml contienen: hexetidina 100 mg, excipientes: alcohol 10 ml, sacarina sódica 27.800 mg, sorbitol y otros c.s.

La hexetidina es un derivado de pirimidina al que se le atribuyen propiedades antisépticas así como la de acelerar la cicatrización postcirugía periodontal (Donnazzan, 1963; Leydiger 1961; Simring, 1963). La hexetidina tiene una acción inhibitoria limitada de la placa. Su acción antiplaca se reforzaría con las sales de Zinc. Su sustantividad es de 1-3 horas, al estudiar su efectividad en la curación de úlceras aftosas, no se encontró ningún beneficio sobre una higiene oral convencional. Además la hexetidina en concentraciones mayores del 0,1% puede producir úlceras orales. (...) la hexetidina tiene algún efecto inhibitor de placa y aunque éste se ve mejorado en combinación con Zn, sigue siendo menor en comparación con el efecto antigingivitis y antiplaca de clorhexidina al 0,2%.<sup>70</sup>

### 1.3 LA FITOTERAPIA

#### 1.3.1 Descripción general

Una de las actividades más antiguas del ser humano es el estudio de plantas, sobretodo como una importante fuente de alimento. Desde siempre, el ser humano tuvo la necesidad de distinguir “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.”<sup>71</sup> Sin dudarlo, existen infinidad de especies de plantas que contienen sustancias o principios activos de importancia para el tratamiento de enfermedades y que aún están por descubrir.

“Muchas especies son estudiadas con frecuencia para hallar en ellas su posible valor farmacológico, en especial por sus propiedades estrogénicas, antipiréticas, antihelmínticas, astringentes, fungicidas, antibióticas.”<sup>72</sup> En la actualidad, las plantas,

---

<sup>70</sup> BASCONES, A y MORANTE, S. Op. Cit. p. 36

<sup>71</sup> ROMERO, Melissa, HERNANDEZ, Yrasema y GIL, Marielsa, *Actividad inhibitoria de la Matricaria recutita “Manzanilla Alemana” sobre el Streptococcus mutans*, [en línea], Caracas, fecha de publicación desconocida, [citado 16-06-2006], Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp>, ISSN: 1317-5823, pp 1-13

<sup>72</sup> Idem, p. 3

sobretudo las medicinales, están recobrando el papel protagónico “que tuvieron en los primeros tratamientos médicos, se aprecia un nuevo auge de las aplicaciones terapéuticas de las plantas, una recuperación de su uso”<sup>73</sup> y es así que nace la fitoterapia, es decir, “la técnica médica que se sirve de las plantas (del griego *phytos*, planta) para combatir las enfermedades y restablecer los equilibrios de la salud.”<sup>74</sup>

### **1.3.2 Sustancias Naturales con Actividad Antimicrobiana**

Si se entiende por “natural” lo que el Diccionario de la Real Academia de la Lengua define como “aquello perteneciente o relativo a la naturaleza”, se entiende que esto engloba diversos aspectos:

1) Deben ser considerados los elementos naturales que constituyen la tabla periódica, dentro de estos, los utilizados como antimicrobianos son “el oxígeno, el yodo y el arsénico, empleados para la infección por anaerobios, la desinfección y el tratamiento de la sífilis respectivamente.”<sup>75</sup>

2) Es necesario tomar en cuenta a las “sustancias producidas por microorganismos con carácter biocida, haciendo especial hincapié en el papel de los probióticos.”<sup>76</sup>

3) Otro aspecto esencial constituyen las “sustancias sintetizadas por individuos del reino animal que presentan igualmente actividad antimicrobiana, con especial referencia a los compuestos de origen peptídico.”<sup>77</sup>

4) Finalmente, sin duda, el reino vegetal es el que proporciona la mayor cantidad y variedad de sustancias antimicrobianas aplicadas a las enfermedades humanas.

---

<sup>73</sup> ROMERO, Melissa, HERNANDEZ, Yrasema y GIL, Marielsa, Op. Cit. p. 3

<sup>74</sup> BUENO, Mariano, *Fitoterapia*, [en línea], lugar de publicación desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 04-11-2010], Instituto de Medicina Biológica y Antienviejecimiento, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.biosalud.org/archivos/divisiones/4311Fitoterapia.pdf>, pp 1-9

<sup>75</sup> DOMINGO, D y LÓPEZ-BREA, M, “Plantas con acción antimicrobiana”, *Rev Esp Quimioterap*, Vol 16, Nº4, España, Diciembre 2003, pp 385-393

<sup>76</sup> Ídem, p. 1

<sup>77</sup> Ídem, p.1

### 1.3.3 Sustancias de origen vegetal con actividad antimicrobiana

Los trabajos realizados por Pasteur y Fleming (siglo XIX, inicios del siglo XX) fueron fundamentales en el conocimiento de las enfermedades de tipo infecciosas (producidas por microorganismos) y su tratamiento, pero el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas data de mucho tiempo atrás. “Existen pruebas de que los hombres del Neandertal que ocuparon Irak hace 60000 años usaban las plantas con fines medicinales.”<sup>78</sup> Posteriormente, a lo largo de la historia existen otros ejemplos bien documentados, como lo son “las figuras de Hipócrates en la medicina griega, Avicena en la árabe y Paracelso en la centroeuropea, que fueron auténticos especialistas en la aplicación de las plantas en medicina.”<sup>79</sup>

Un ejemplo cercano a nuestra cultura, es el uso del primer antipalúdico, que lleva su nombre debido a que con él, fue tratada la condesa de Chinchón, virreina del Perú en el siglo XVII. Debido a esto, la planta tomó el nombre de *Cinchona officinalis* y su principio activo de quina.<sup>80</sup>

“Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios”<sup>81</sup> (se diferencian de los primarios en que no son indispensables para la vida de la planta). Un porcentaje representativo de estos compuestos muestran actividad antimicrobiana. El por que de la existencia de estos compuestos en las plantas aún es desconocida. Al respecto existen algunas teorías: “podrían ser compuestos con diferentes funciones y de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin.”<sup>82</sup>

Las plantas son capaces de fabricar compuestos ilimitadamente, la mayoría de estos, tienen relación con el fenol y sus derivados.<sup>83</sup> Los principales compuestos con actividad antimicrobiana elaborados por las plantas, según D. Domingo y M. López, son:

---

<sup>78</sup> DOMINGO, D y LÓPEZ-BREA, Op. Cit., p.1

<sup>79</sup> Ídem, p.1.

<sup>80</sup> Ídem, p. 1

<sup>81</sup> Ídem, p. 2.

<sup>82</sup> Ídem, p. 2

<sup>83</sup> Ídem, p. 2

- **Fenoles y heterósidos fenólicos:** Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos son el catecol, el pirogalol, el ácido cinámico y cafeico. Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo, al parecer están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, así, a mayor hidroxilación mayor toxicidad. El mecanismo de acción parecer estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas. Dentro de este grupo se encuentran los aceites esenciales que son mezclas de estos compuestos.<sup>84</sup>
- **Taninos:** Son compuestos fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua, alcohol y acetona e insolubles en éter, benceno y cloroformo. Su composición química es variable pero tienen una característica común: ser astringentes y coagular los alcaloides, albúminas y metales pesados. Su aplicación más antigua es en la industria del cuero, para el proceso de curtido. Aprovechando su capacidad para precipitar las proteínas, fueron aplicados en los tejidos vivos, empleándolas sobretodo en tratamientos del tracto gastrointestinal y en escoriaciones y quemaduras de la piel. Los taninos se dividen, en función de su capacidad para ser hidrolizados en: hidrolizables y condensados. Se han descrito alrededor de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias.<sup>85 86</sup>
- **Cumarinas:** Son compuestos derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral.<sup>87</sup>
- **Flavonas y compuestos relacionados:** Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad ante los microorganismos probablemente se debe a

---

<sup>84</sup> DOMINGO, D y LÓPEZ-BREA, M, Op. Cit., p.4

<sup>85</sup> Ídem, p.3

<sup>86</sup> AÑANCA, Erick, Op. Cit., p. 16

<sup>87</sup> DOMINGO, D y LÓPEZ-BREA, M, Op. Cit., p.3

que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de manera similar a las quinonas.<sup>88</sup>

- **Alcaloides:** Son compuestos nitrogenados heterocíclicos. El mecanismo de acción de los alcaloides parecer ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo.<sup>89</sup>
- **Aceites esenciales:** Son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas. Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos pertenecientes a diferentes grupos químicos: hidrocarburos (compuestos terpénicos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles.<sup>90</sup>

### 1.3.4 Aceites Esenciales: definición y propiedades

“Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. Oficialmente, se conocen como aceites esenciales a los productos que pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de algunos frutos.”<sup>91</sup>

Comúnmente también se los denomina esencias, sin embargo, esta denominación es más amplia ya que no solo incluye a los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente. La mayoría son casi transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos). Algunos son inflamables. Generalmente son menos densos que el agua (con excepciones como el aceite de clavo y canela). Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua, son lipófilos por lo tanto, solubles en solventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc). La solubilidad en alcohol es variable y generalmente son solubles en alcoholes de alta graduación. Tienen índices de refracción elevados y presentan actividad

---

<sup>88</sup> DOMINGO, D y LÓPEZ-BREA, M, Op. Cit.,p.3

<sup>89</sup> Ídem, p. 3

<sup>90</sup> ZEKARIA, Dan, *Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos*, [en línea], lugar de publicación desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 20-10-2010], Laboratorios Calier, formato pdf, disponible en Internet: [http://www.calier.es/pdf/Microsoft\\_Word\\_-\\_Aceites\\_esen\\_como\\_promotores.pdf](http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_-_Aceites_esen_como_promotores.pdf), pp 1-6

<sup>91</sup> KUKLINKSKI, Claudia, *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*, Primera reimpression, Ediciones Omega, Barcelona-España, 2000, p. 134.

óptica (desvían el plano de la luz polarizada, tienen poder rotatorio). Se oxidan fácilmente y polimerizan dando productos resinosos.<sup>92</sup>

### 1.3.5 Distribución y localización

Los aceites esenciales se encuentran casi exclusivamente en los vegetales superiores, “existirían, según Lawrence, 17.500 especies aromáticas.”<sup>93</sup> Concretamente, los aceites esenciales se encuentran en algunas familias de las Angiospermas, de las cuales destacan por ejemplo: Myrtaceae (eucalipto, clavo), Laureaceae (canela), Rutaceae (cítricos), Lamiaceae (menta, melisa, lavanda), Asteraceae (manzanilla), Apiaceae (anís, hinojo), Poaceae, Zingiberaceae (jengibre), etc.<sup>94</sup>

Los aceites esenciales pueden ser almacenados por la planta en diferentes órganos: en las flores (nardo, rosas), en las hojas (laurel, eucalipto), en las cortezas (canela), en los leños (sándalo), en las raíces (vetiver), en los rizomas (jengibre), en los frutos (anís), en las semillas (nuez moscada). Se acumulan en cavidades secretoras, en células, en pelos secretores, en canales secretores, etc. Aunque todos los órganos de la misma planta pueden contener aceite esencial, la composición de éste puede variar según su localización.<sup>95</sup>

Cuantitativamente, los contenidos de aceite esencial en las plantas son bajos, frecuentemente este contenido es inferior a 10 ml/kg de planta. Contenidos elevados son raros (por ejemplo de los botones florales del clavero se puede extraer hasta 150 ml/kg en droga seca).<sup>96</sup>

### 1.3.6 Funciones en las plantas

En las plantas, los aceites esenciales pueden desempeñar varias funciones, algunas de las cuales incluso aún no están claramente descritas. Es probable que tengan un rol fundamental ejerciendo: protección a la planta contra los depredadores y atracción de

---

<sup>92</sup> KUKLINKSKI, Claudia, Op. Cit., p. 134

<sup>93</sup> BRUNETON, Jean, *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*, Segunda Edición, Editorial Acibria S.A., Zaragoza-España, 2001, p. 481.

<sup>94</sup> KUKLINKSKI, Claudia, Op. Cit. p.135

<sup>95</sup> BRUNETON, Jean, Op. Cit., p. 482

<sup>96</sup> Ídem, p.482

agentes polinizadores (insectos). Experimentalmente se ha comprobado que algunos aceites esenciales cumplen un papel en el campo de las interacciones vegetales (agentes alelopáticos<sup>97</sup>, especialmente inhibidores de la germinación). Por otro lado, podrían constituir el soporte de una comunicación y transmisión de mensajes biológicos selectivos.

### 1.3.7 Composición química

Los aceites esenciales son mezclas complejas y variables de componentes (a veces más de 200) pertenecientes, de manera casi exclusiva, a dos grupos de orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpenoides y el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano. Pueden también contener compuestos de diversos orígenes.<sup>98</sup>

- **Terpenoides:** en los aceites esenciales se encuentran solamente los terpenos más volátiles, es decir, los de menor peso molecular: monoterpenos (acíclicos: mirceno, monocíclicos: p-cimeno, bicíclicos: pineno) y sesquiterpenos (hidrocarburos monocíclicos o policíclicos:  $\beta$ -bisaboleno, alcoholes: farnesol, cetonas: nootkatona, aldehídos: sinensales, ésteres: acetato de cedrilo).<sup>99</sup>
- **Derivados del fenilpropano:** Son menos frecuentes. Se trata generalmente de alil y propopenilfenoles, a veces de aldehídos y lactonas. Se pueden encontrar compuestos en C6-C1 como la vainillina.<sup>100</sup>
- **Compuestos de orígenes diversos:** Son compuestos que resultan de la transformación de moléculas no volátiles. Dentro de estos se encuentran los compuestos procedentes de la degradación de:
  - **Ácidos grasos:** originan ácidos, alcoholes, aldehídos y ésteres, por ejemplo: hexenales, ácidos jazmónicos.<sup>101</sup>

---

<sup>97</sup>Se define como agentes alelopáticos a las sustancias químicas liberadas por las plantas que provocan un efecto perjudicial sobre la germinación o el desarrollo de otras plantas.

<sup>98</sup> BRUNETON, Jean, Op. Cit., p. 82

<sup>99</sup> Idem, p. 482

<sup>100</sup> Idem, p. 482

<sup>101</sup> Idem, p. 486

- **Terpenos:** iononas (proviene de la auto-oxidación de los carotenos), ironas (proviene de la oxidación de triterpenos bicíclicos), compuestos nitrogenados (raros en los aceites esenciales: pirazinas, también pueden haber aminas alifáticas volátiles: metilamina).<sup>102</sup>

Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales pueden constituir hasta un 85% de su composición total, mientras que el 15% restante, son compuestos que se presentan en trazas. La concentración de un compuesto específico en un aceite esencial puede ser muy variable ya que, son muchos los factores que intervienen en la composición del aceite esencial entre ellos, los más importantes son: el lugar de origen de la planta, la especie y el órgano de la planta del cual es extraído el aceite, las condiciones climáticas y de crecimiento de la planta (uso de fertilizantes, tipo de tierra de cultivo, etc), el proceso de destilación así como la forma de almacenamiento del aceite, entre otros.<sup>103</sup>

### 1.3.8 Aplicaciones y propiedades farmacológicas

Las aplicaciones de los aceites esenciales son múltiples y variadas. Se utilizan por sus propiedades aromáticas en la industria: alimentaria, cosmética (en perfumería) y química (productos de limpieza). Por sus propiedades farmacológicas se los usa en la industria farmacéutica y cosmética.<sup>104</sup>

En el ámbito farmacéutico, los aceites esenciales tienen algunas propiedades y son usados tanto por vía tópica (externa, sobre la piel) como por vía interna. Según Kuklinkski las propiedades o acciones fundamentales de los aceites esenciales son:

- **Poder antiséptico:** El mismo se manifiesta frente a diversas bacterias patógenas (grampositivas o gramnegativas), incluso cepas generalmente resistentes a los antibióticos. Algunos aceites esenciales son activos frente a hongos y levaduras (*Candida*). Las dosis activas son bajas y se determinan mediante experimentación in vitro. El poder antiséptico de los aceites

---

<sup>102</sup> BRUNETON, Jean, Op. Cit., p. 486

<sup>103</sup> ZEKARIA, Dan, Op. Cit., p. 2.

<sup>104</sup> KUKLINKSKI, Claudia, Op. Cit. p.140

esenciales es variable: los aceites que tienen componentes con un grupo fenol tienen un elevado poder antiséptico; los que tienen componentes con función alcohol tienen un poder antiséptico medio, los que tienen componentes con función cetona tienen un bajo poder antiséptico.

- **Propiedades antiespasmolíticas:** Disminuyen los espasmos gastrointestinales y aumentan las secreciones gástricas, por lo que se los ha calificado como digestivos, estomáquicos, carminativos, colagogos (facilitan la salida de la bilis de la vesícula al duodeno) y coleréticos (facilitan la secreción de la bilis por parte de las células hepáticas).
- **Propiedades sedantes:** Algunos aceites esenciales tienen propiedades sedantes en caso de nerviosismo y angustias. Mejoran insomnios y trastornos psicossomáticos diversos.
- **Propiedades irritantes:** Varios aceites esenciales, usados por vía tópica, provocan el aumento de la circulación capilar y epidérmica y producen enrojecimiento (efecto rubefaciente). Otros producen una sensación de calor externa.
- **Propiedades analgésicas:** Ciertos aceites esenciales aplicados por vía tópica presentan una acción analgésica frente a dolores musculares, articulares por tal motivo, son usados en pomadas, cremas, geles que alivian esguinces, distenciones, algias articulares o musculares.
- **Otras propiedades:** Muchos aceites esenciales son cicatrizantes y vulnerarios (ayudan a sanar heridas). Unos actúan sobre el árbol bronquial ayudando a la fluidificación de las secreciones (son expectorantes); otros actúan sobre el aparato renal ejerciendo una acción diurética.

Muchos de los aceites esenciales son tóxicos, por esta razón es importante que se controle su uso y administración. Los efectos tóxicos pueden ser a nivel del sistema nervioso (neurotoxicidad, convulsiones, asfixia, trastornos síquicos) y a nivel dérmico (irritante, sensibilizante, fototóxica).<sup>105</sup>

---

<sup>105</sup> KUKLINKSKI, Claudia, Op. Cit. p.142

### 1.3.9 Propiedades antimicrobianas: mecanismos de acción

Como se ha mencionado anteriormente, los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido definido completamente. En la actualidad, los estudios sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han centrado en la utilización de microorganismos patógenos para el ser humano.<sup>106</sup>

Diversos estudios determinan que los aceites procedentes de: clavo, canela, mostaza, orégano, romero y tomillo son los que poseen actividad antimicrobiana más acentuada (Deans 1987). Sin embargo, aún no se ha establecido un procedimiento estandarizado en las pruebas de Laboratorio in vitro. Normalmente estas pruebas consisten en la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que impide el crecimiento de la bacteria enfrentando un número concreto de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la bacteria en cuestión con el agente antimicrobiano. Al ser los aceites esenciales liposolubles, se realizan diluciones dobles seriadas de los aceites en caldo con emulsionante (Zaika 1988). A la hora de determinar las CMI hay que tener en cuenta la volatilidad del compuesto así como su grado de difusión en el medio.(...)

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula.

Los aceites esenciales en general ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas. Esto puede deberse a la influencia de la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales, de naturaleza lipofílica.

En el caso de las bacterias Gram negativas sensibles, así como de las Gram positivas, los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables. Como consecuencia, tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular.

Parece que para obtener un mayor efecto antibacteriano la dosis a aplicar es relativamente reducida, del orden de 100 a 200 ppm(...) Dosis superiores no producen necesariamente un mejor efecto.

Generalmente, los aceites esenciales que poseen notables propiedades antimicrobianas, contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol, el timol y el eugenol. El carvacrol (componente mayoritario del orégano) y el timol (procedente del tomillo) son capaces, (...), de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas.(...) El eugenol, (componente mayoritario del aceite de clavo), y el cinamaldehído (componente de la canela) actúan inhibiendo la producción de enzimas

---

<sup>106</sup> ZERAKIA, Dan, Op. Cit. p. 3

intracelulares, tales como, amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular.<sup>107</sup>

### 1.3.10 Aceite Esencial de Ishpingo: Composición y usos

La identificación química de los componentes del aceite esencial foliar de ishpingo se encuentra aún en una fase inicial, tanto a nivel nacional como internacional. Sin embargo, Noriega y Dacarro, en nuestro país, realizaron la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial de la hoja de ishpingo. Esta investigación arroja datos interesantes que van a ser descritos a continuación.

Los principales componentes del aceite foliar de ishpingo son: cariofileno (19.029%), humuleno (14.324%) y eremofileno (11.407%) de un total de 62 compuestos identificados (Ver Tabla 3).

<b>Tabla 3. Composición química del aceite foliar de ishpingo</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Identificado (%)</b>
Acetol	0.055
Benzaldehído	0.886
Canfeno	0.250
Cimeno	0.062
Cinamato de metil	7.214
Cinimaldehído	3.425
Hidroxicinemaldehído	0.113
Terpinolen	0.197
Cinamato de etilo	4.733
Copaeno	7.000
Cumeneno	0.172
Espatuleno	0.280
Mosleno	0.291
Oxido de cariofileno	3.831
p-cimeno	2.951

Fuente: NORIEGA, Paco y DACARRO, Cesare, *Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica*, 2008

Es importante mencionar que los estudios respecto a los usos del aceite esencial de ishpingo son escasos. Noriega y Dacarro en su estudio, demuestran que este aceite tiene una alta capacidad inhibitoria contra hongos (*Candida albicans*) y bacterias

<sup>107</sup> ZERAKIA, Dan, Op. Cit. p. 4

(*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans*).

Es interesante el hecho de que este aceite a concentraciones que van desde 50 a 0.097 µl/L inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Para el caso de *Streptococcus pyogenes* el rango es un poco menor, las concentraciones que inhiben su crecimiento van de 50-0.39 µl/L.<sup>108</sup>

### 1.3.11 Aceite Esencial de Clavo de olor: Composición y usos

El contenido de aceite esencial en la planta de clavo es excepcional: 150 a 180 ml/kg. Mayoritariamente contiene un propenilfenol: el eugenol (75-88%). Se encuentra en forma libre pero también en forma de acetato de eugenilo (4-15%). Otros compuestos que se encuentran en este aceite esencial son: cavicol, 4-alil-fenol, ésteres (20%), sesquiterpenos (5-6%),  $\alpha$  y  $\beta$ -cariofileno (5-12%),  $\alpha$  y  $\beta$ -humuleno, calacoreno, calameneno,  $\alpha$ -muruleno,  $\alpha$ -amorfenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno, salicilato de metilo,  $\beta$ -amirina. Según la Real Farmacopea Española, la concentración del aceite esencial de la droga no debe ser inferior al 15%.<sup>109</sup>

El contenido de aceite esencial en las hojas presenta una menor concentración (2%) siendo su principal componente el eugenol (82-88%). En la corteza llega al 4-6% y su contenido de eugenol es aún mayor: 90-95%. Este aceite tiene la particularidad de ser más pesado que el agua, es de color amarillo, tornando al parduzco en contacto con el aire.<sup>110</sup>

El alto contenido de eugenol (o ácido cariofilico) le proporciona a este aceite esencial propiedades antisépticas, bactericidas, fungicidas, parasiticidas y antimicóticas. En odontología, sus propiedades antisépticas hicieron que forme parte de numerosos preparados y enjuagues bucales ya que, demuestra actividad inhibitoria frente a microorganismos periodontales.<sup>111</sup>

---

<sup>108</sup> NORIEGA, Paco y DACARRO, Cesare, "Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica", *La Granja*, Vol 7, Nº 1, Ecuador, Julio 2008, pp. 3-8

<sup>109</sup> ALONSO, Jorge, *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*, 1era Reimpresión, Editorial Corpus, Rosario-Argentina, 2007, p. 346

<sup>110</sup> Idem, p. 346

<sup>111</sup> ALONSO, Jorge, Op. Cit. p. 346

El aceite de clavo resulta interesante por sus propiedades anestésicas locales (inhibe la conducción nerviosa), también es antiinflamatorio (inhibe la síntesis de prostaglandinas y la quimiotaxis de leucocitos). A bajas concentraciones ( $10^{-2}$  –  $10^{-3}$  mM/l) es bactericida. Por vía general y a dosis elevadas (0,5 ml/kg), el aceite esencial de clavo es tóxico, sobretodo en niños pequeños a los que provoca depresión del SNC, necrosis hepatocelular, convulsiones y trastornos de la coagulación. Se metaboliza rápidamente. La industria usa este aceite para producir eugenol destinado a síntesis, especialmente de vainillina. Se recomienda el uso de este aceite esencial en gargarismos al 1-5% en agua.<sup>112</sup>

## **1.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **1.4.1 Antecedentes**

La investigación de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana así como el tratamiento de las enfermedades producidas por microorganismos, día a día es más complicada. Frecuentemente nuevas sustancias están siendo producidas y probadas para uso humano, pero al mismo tiempo muchas especies bacterianas son cada vez menos sensibles a estas sustancias.<sup>113</sup>

“Hacia fines de los años 50, no existía un procedimiento estandarizado aceptable para los test de sensibilidad. Es así como en el año 1977, en Ginebra, integrantes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) expresaron su alarma por el creciente aumento de la resistencia a antibióticos en el mundo, causado a menudo por el uso indiscriminado de estos productos.(...) Por esta razón, es necesario mantener una estrecha vigilancia utilizando pruebas de sensibilidad fidedignas que proporcionen datos comparables.”<sup>114</sup>

---

<sup>112</sup> Ídem, p. 346

<sup>113</sup> CASTRO, Viviana, Op. Cit., p. 33.

<sup>114</sup> Ídem, p. 33

## 1.4.2 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos “son técnicas que investigan la actividad de distintos agentes quimioterapéuticos”<sup>115</sup> frente a un microorganismo; sirven para identificar al microorganismo y para implantar la terapia más efectiva.

Todas las bacterias no tienen la misma sensibilidad a los distintos antibacterianos, de ahí la importancia de realizar estas determinaciones. La evaluación de esta sensibilidad nos va a ayudar en la selección del compuesto más adecuado para el tratamiento de una infección bacteriana. Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un agente antibacteriano están basadas en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente.<sup>116</sup>

La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico determinado viene dada por la concentración mínima inhibitoria (CMI o MIC), que se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada. Algunos métodos permiten además determinar lo que se denomina concentración mínima bactericida (CMB), que es la menor concentración de antimicrobiano capaz de eliminar (muerte celular) una cepa bacteriana dada. Así, el objetivo terapéutico será alcanzar en el organismo la CMI o CMB con dosis no tóxicas.<sup>117</sup>

Los métodos más utilizados para determinar la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos son: la difusión en agar y la dilución en caldo o agar y se conocen en general con el nombre de antibiograma.

### 1.4.2.1 Antibiograma por difusión en agar

El fundamento de esta técnica es que “discos impregnados con antimicrobiano se depositan sobre cultivos de microorganismos en placa. Por difusión del agente antimicrobiano a través del medio se produce un halo de inhibición del crecimiento, cuyo diámetro es proporcional a la acción del agente antimicrobiano.”<sup>118</sup>

---

<sup>115</sup> GRANADOS, Raquel y VILLAVERDE, M, *Microbiología Tomo II*, Segunda Edición, Thomsom Editores, Paraninfo S.A., España, 2002, p. 156

<sup>116</sup> GAMAZO, Carlos y otros, *Manual práctico de Microbiología*, 3ra Edición, Masson S.A., Barcelona-España, p. 121

<sup>117</sup> Ídem, p. 121

<sup>118</sup> GRANADOS, Raquel y VILLAVERDE, M. Op. Cit. p. 162, 163

Este método fue estandarizado por Bauer et al en 1966. Este estudio dio lugar al método de Kirby-Bauer, que es el recomendado por la Food and Drug Administration (FDA) y el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), aunque con ligeras modificaciones.

Varios factores afectan al tamaño del halo de inhibición: la carga de antibiótico en los discos, la difusión del antibiótico en el medio de cultivo, el tamaño del inóculo bacteriano, la composición y el grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación.<sup>119</sup>

Según Gamazo y otros, la técnica consiste en:

- a. Preparar cultivos de 18 horas de las bacterias que hay que ensayar en agar tripticasa soja (TSA) o agar infusión cerebro-corazón (BHIA).
- b. Inocular una porción de una colonia (bacteria en estudio) en 5 ml de caldo de tripticasa soja (TSB) o caldo de infusión cerebro-corazón e incubar a 37°C hasta que la turbidez sea visible (2-5 horas, fase logarítmica). Ajustar la turbidez con solución salina o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland. De forma alternativa, como un método más rápido, se puede preparar directamente a partir de la colonia aislada en el medio de agar (fase estacionaria), resuspendiéndola en solución salina o caldo de cultivo estéril hasta lograr la turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland.
- c. Utilizar un hisopo de algodón para tomar el inóculo: sumergirlo en la suspensión y eliminar el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo que lo contiene.
- d. Inocular la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton (por ser el que ofrece una composición homogénea en todos los lotes y gran reproductibilidad, no presenta efectos antagónicos y permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos) con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones. Por último, pasar el hisopo por el perímetro externo del agar. Dejar secar 5 minutos.
- e. Colocar los discos de antibióticos o sustancias antimicrobianas sobre la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar. Los discos no deben estar a menos de 15 mm de

---

<sup>119</sup> GAMAZO, Carlos y otros, Op. Cit. p. 122

los bordes de la placa y lo bastante separados entre sí para que no se superpongan las zonas de inhibición (aproximadamente 20 mm). Dejar las placas 15 minutos a temperatura ambiente. La difusión del agente antimicrobiano es casi instantánea por eso, no se debe mover ningún disco una vez implantados.

- f. Incubar la placa en posición invertida a 37°C durante 18-24 horas. No se debe exceder este tiempo de incubación.
- g. Medir los diámetros de las zonas de inhibición con una regla o un calibrador utilizando luz refleja sobre un fondo negro.

Los diámetros de los halos de inhibición se traducen a las categorías de microorganismo resistente (R), intermedio (I), moderadamente sensible (MS) o sensible (S), de acuerdo a tablas interpretativas.

#### **1.4.2.2 Antibiograma por dilución en caldo**

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión normalizada de bacterias frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas que reducen la concentración a la mitad) en un medio líquido estandarizado. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución). (...) <sup>120</sup>

La técnica de macrodilución consiste en diluir el antibiótico a una concentración final entre 128 y 0.5µg/ml en el caldo de cultivo. Se utiliza un tubo sin antibiótico como control del crecimiento bacteriano. Una cantidad estandarizada del aislamiento bacteriano es entonces inoculada en cada uno de los tubos. Luego del período de incubación (24 horas) se realiza la lectura del crecimiento o ausencia de crecimiento en cada una de las concentraciones. La MIC es aquella concentración más baja ensayada que inhibe el crecimiento bacteriano.

Además de la CMI es necesario en ocasiones, evaluar el efecto bactericida de un antibiótico sobre una bacteria para determinar la concentración mínima bactericida (CMB). La CMB se puede calcular partiendo del método de dilución en caldo

---

<sup>120</sup> s/a, *Métodos de laboratorio para ensayos de sensibilidad de bacterias frente a antimicrobianos*, Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004, [citado 21-11-2010], formato pdf, disponible en Internet: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/1.1.10\\_Metodos\\_de\\_laboratorio.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/1.1.10_Metodos_de_laboratorio.pdf), p.115.

determinando la proporción de bacterias viables después de 18-24 horas de contacto con el caldo que contiene el antimicrobiano. Para ello, a partir de cada uno de los tubos sin desarrollo bacteriano, se inocula con un hisopo estéril sobre placas con agar, se incuban las placas a 37°C durante 18 horas y se cuentan el número de colonias en las placas para la determinación de la CMB. Se considera CMB como la menor concentración de antibiótico cuyo subcultivo produce un número de colonias menor al 0.1% del inóculo original.<sup>121</sup>

---

<sup>121</sup> GAMAZO, Carlos y otros, Op. Cit., p. 127, 130, 131.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria cosmética es una de las más lucrativas en el mundo. Factura 200.000 millones de dólares anuales, según evaluaciones de Latin American Markets. Sin embargo, la mayor parte de esta industria usa materias primas y principios activos de síntesis orgánica, son escasas las industrias que están usando principios activos de origen natural (principalmente vegetales).

Según la CORPEI, en nuestro país, la industria cosmética natural representa el 4.5% del mercado cosmético, tiene una tasa de crecimiento promedio del 9% anual y está dominada por una serie de multinacionales como Unilever (Holanda), L'Oreal (Francia), Wella y Beiersdorf (Alemania). La escasa producción de cosméticos naturales es realizada por pequeñas industrias como: Laboratorios Meres y Fundación Chankuap, esto, a pesar de la gran riqueza natural existente en nuestro país. Además, los esfuerzos realizados en cuanto al aprovechamiento de los recursos naturales existentes en nuestro país, no son correctamente enfocados, puesto que, únicamente el Ecuador exporta materias primas naturales (aceites esenciales por ejemplo) a otros países (Brasil, Colombia, Japón principalmente) donde son transformadas en productos elaborados.

Los enjuagues bucales y colutorios, son productos considerados como cosméticos o cosmoceuticals<sup>122</sup>. La mayoría, se comercializan libremente, y se utilizan para eliminar la placa bacteriana existente en la cavidad bucal, cuya acumulación ocasiona a largo plazo, problemas como caries y gingivitis.

En el mercado existen un sinnúmero de enjuagues bucales, sin embargo, ninguno de ellos contiene en su fórmula aceites esenciales de plantas nativas (como el ishpingo).

Por lo anterior, mediante esta investigación se pretende formular un colutorio que contenga como principios activos los aceites esenciales provenientes de dos plantas: ishpingo (*Ocotea quixos*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) ya que, existe

---

<sup>122</sup> Son productos que contienen elementos cosméticos y fármacos, además tienen uno o más ingredientes bioactivos. Representan una nueva categoría en el mercado de los productos cosméticos.

bibliografía<sup>123</sup> que indica el poder antiséptico o antimicrobiano de estos aceites esenciales, convirtiéndose en una alternativa para el consumidor y un aporte a la investigación en el campo de los cosméticos naturales.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Como se ha mencionado, la industria cosmética es una de las más lucrativas en el mundo. Existen un sinnúmero de industrias, pero la mayor parte de ellas, usa principios activos provenientes de procesos de síntesis química. Hoy por hoy, sin embargo, estas mismas industrias están invirtiendo grandes cantidades de dinero en investigación de nuevos principios activos, sobretodo de origen vegetal, ya que la tendencia de la actualidad es volver a lo natural.

Por lo anterior, es importante el aporte investigativo en el campo de los cosméticos naturales, puesto que éstos tienen importantes ventajas comparativas frente a los cosméticos tradicionales. Los cosméticos naturales acarrear menos riesgos a la salud humana debido a que los extractos y aceites esenciales usados en ellos son mezclas de compuestos sintetizados por las plantas; estos compuestos a la vez, tienen un efecto sinérgico entre ellos, ejercen su acción a menor dosis y con menor toxicidad que los productos químicos. Además los componentes de las plantas presentes en sus extractos y aceites esenciales, se potencian entre si pero a la vez, se protegen de los efectos indeseables unos de otros.

Por esta razón, es importante que en nuestro país se empiece a invertir en la industria cosmética, ya que su desarrollo a más de contribuir a crear fuentes de trabajo aumentaría la producción local y nacional. Esto es vital ya que nuestro país dejaría de ser exportador de materias primas y se abriría la posibilidad de exportar cosméticos naturales, lo que a su vez, aumentaría las divisas para nuestro país. De esta manera, dejaríamos de importar como se lo ha hecho hasta la actualidad productos que se podrían hacer aquí a menores costos y de la misma o mejor calidad.

---

<sup>123</sup> NORIEGA, Paco y DACARRO, Cesare, “Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica”, *La Granja*, Vol 7, Nº 1, Ecuador, Julio 2008, pp. 3-8

Otro aspecto importante a considerar es la importancia que tienen los enjuagues bucales en la salud oral o bucal. La cavidad bucal es una parte muy importante de nuestro cuerpo. Con ella, realizamos algunas actividades primordiales como hablar y comer, de allí que mantenerla saludable no sólo es símbolo de higiene sino que contribuye a la salud general de nuestro cuerpo.

Para mantener o mejorar la salud de la cavidad bucal, hoy en día existen en el mercado una infinidad de productos de diferentes marcas pero con un objetivo común: disminuir el crecimiento de la placa bacteriana, eliminar el mal aliento y(o) fortalecer los dientes. Dentro de estos productos se encuentran los enjuagues bucales y colutorios, los mismos que son considerados como productos cosméticos.<sup>124</sup>

El mercado oferta una variedad de enjuagues bucales de diferentes marcas, dentro de los más conocidos están: Listerine, Colgate Plax, Encident y Oraldine; sin embargo, en el Ecuador, ninguno de ellos usa como principios activos los aceites esenciales provenientes de plantas. La elaboración y demostración de la eficacia de un enjuague bucal o colutorio con estos principios activos sería un aporte a la investigación en el campo de los cosméticos naturales, que como se ha mencionado con anterioridad es incipiente en nuestro país.

Finalmente, considero importante mencionar que con esta investigación, la investigadora fortalecerá sus competencias en:

- Despertar el interés por la investigación y aporte a la ciencia
- Conocer como se ejecuta y se lleva adelante un proceso investigativo.

#### **4. HIPÓTESIS**

El colutorio elaborado con aceites esenciales de la hoja de ishpingo (*Ocotea quixos*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) tiene un efecto bactericida en un medio de cultivo con *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, habitantes de la placa

---

<sup>124</sup> GUADRÓN, José, Op. Cit., p. 2

bacteriana, causantes de enfermedades importantes como la caries e infecciones de garganta respectivamente.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Determinar la eficacia in vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo (*Ocotea quixos*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

### **5.2 Específicos**

1. Determinar la Concentración Mínima Bactericida de los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*.
2. Realizar un estudio sensorial preliminar con los enjuagues bucales comerciales que guie a la formulación del colutorio.
3. Formular y elaborar un colutorio con las características propias para este tipo de productos que contenga como principios activos a los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor.
4. Comparar la eficacia in-vitro del colutorio elaborado frente a cuatro enjuagues bucales comerciales: Listerine, Encident, Colgate Plax, Oraldine.
5. Realizar un estudio de estabilidad acelerada del colutorio elaborado.
6. Comparar el perfil organoléptico del colutorio elaborado frente al enjuague bucal preferido por los consumidores y tomado como estándar.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Lugar de Investigación**

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del CIVABI (Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad) de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Campus Girón.

## **6.2 Obtención e identificación de los microorganismos seleccionados para la investigación**

Los microorganismos a utilizar (*Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) se obtuvieron del cepario del laboratorio de Microbiología del CIVABI de la UPS. Dichos microorganismos se encontraban liofilizados en pastillas (Microorganismos Kwik-Stick, marca Microbiologics) por tal motivo, se hidrataron y activaron en tubos con 5 ml de caldo estéril TSB (Trypticase Soya Broth) marca Criterion. Posteriormente, se sembraron en cajas petri con Agar Infusión Cerebro Corazón marca Pronadisa y se incubaron en la estufa a 37°C durante 24 horas para *S. pyogenes* y 48 horas para *S. mutans*.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar pruebas específicas como: la tinción Gram (Ver Anexo 1) y la prueba de la catalasa (Ver Anexo 2) para ambas cepas, de manera que se verificó que los microorganismos a utilizar eran *S. mutans* y *S. pyogenes*.

## **6.3 Obtención de los aceites esenciales**

El aceite esencial de las hojas de ishpingo (*Ocotea quixos*) fue proporcionado por Fundación Chankuap, ubicada en Macas, provincia de Morona Santiago. Se trabajaron con cuatro muestras de este aceite: dos provenientes del Valle del Upano y otras dos provenientes de Transcutukú.

El aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) se obtuvo de Laboratorios Luque, ubicado en Guayaquil, provincia de Guayas.

## **6.4 Análisis físico-químico de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales fueron sometidos a las siguientes pruebas:

- *Características organolépticas*: Por medio de este análisis se confirmó el aspecto, color, sabor y olor de los aceites esenciales. La determinación de

estas características se realizó de manera sensorial es decir, usando los sentidos del olfato, vista y gusto.

- *Determinación del índice de refracción:* Se utilizó un refractómetro. La determinación del índice de refracción permite: identificar una sustancia, verificar la pureza de una muestra, analizar el porcentaje de un soluto en una solución, etc.<sup>125</sup>
- *Densidad:* Se determinó mediante la utilización de un picnómetro. Este instrumento de laboratorio es un pequeño frasco de vidrio de volumen exacto y conocido. Se pesa vacío (m1), luego se llena completamente (incluido el capilar) con agua destilada y se pesa (m2). Finalmente se llena con el líquido cuya densidad se desea determinar y se pesa (m3). Con estos datos se puede calcular la densidad del líquido utilizando la siguiente fórmula:

$$Densidad = \frac{m3 - m1}{m2 - m1}$$

- *Solubilidad en agua:* Se empleó agua destilada. En 5 ml de agua se añadió 0.5 ml de aceite esencial (10%), se agitó durante 1 minuto y se evaluó la solubilidad.
- *Solubilidad en alcohol:* Se empleó alcohol etílico de 96°. En 5 ml de alcohol se añadió 0.5 ml de aceite esencial (10%), se agitó durante 1 minuto y se evaluó la solubilidad.
- *Análisis en GC-MS:* Se trabajó con los aceites esenciales de la hoja de ishpingo para conocer la composición química de los mismos y saber si existen diferencias significativas entre las muestras provenientes del Valle del Upano y las de Transcutukú. Se tomó 1 ml de cada aceite esencial y se diluyó en 2 ml de hexano, posteriormente, se inyectaron 2µL de cada muestra en el equipo y se compararon los cromatogramas resultantes con el cromatograma del aceite esencial de la hoja de ishpingo archivado en el equipo. Las condiciones de trabajo del GC fueron las presentadas en la Tabla 4.

---

<sup>125</sup> s/a, *Refractómetro*, [on line], fecha de publicación desconocida, [citado 28-11-2010], formato pdf, disponible en Internet: [http://tabay.unam.edu.ar/aulavirtual/moodledata/2/REFRACTOMETRO\\_Equipo.pdf](http://tabay.unam.edu.ar/aulavirtual/moodledata/2/REFRACTOMETRO_Equipo.pdf), p. 33

<b>Tabla 4. Condiciones de trabajo del GC</b>			
<i>Modelo GC</i>		3900	
<i>Split ratio</i>		20	
<i>Columna</i>		Factor Four Varian	
<i>Rampa cromatográfica</i>			
Temp (C)	Rate (C/min)	Hold (min)	Total (min)
50	0.0	2.00	2.00
100	20.0	0.00	4.50
260	10.0	0.50	21.00

Fuente: La autora, con base en reporte del equipo

Las condiciones del Espectrómetro de Masas fueron las presentadas en la Tabla 5:

<b>Tabla 5. Condiciones de trabajo del MS</b>	
<i>Modelo</i>	Saturn 2100D
<i>Rango de masas</i>	40-650 m/z
<i>Energía de ionización</i>	70 eV

Fuente: La autora, con base en reporte del equipo

### **6.5 Determinación in-vitro de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor mediante el método de dilución en medio líquido**

Para evaluar la acción de los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* en esta investigación, se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales a través de la técnica de dilución en medio líquido, que contempla enfrentar a los microorganismos mencionados a diferentes concentraciones de los aceites. Los aceites esenciales se incorporan al caldo de cultivo de manera que cada tubo de ensayo tenga una concentración conocida del aceite esencial a ensayar.

Para facilidad de nomenclatura, los aceites esenciales fueron nombrados de la siguiente manera:

A1 = Aceite esencial de la hoja de ishpingo (Valle del Upano)

A2 = Aceite esencial de la hoja de ishpingo (Transcutukú)

A3 = Aceite esencial de la hoja de ishpingo (Transcutukú)

A4 = Aceite esencial de la hoja de ishpingo (Valle del Upano)

A5 = Aceite esencial de clavo de olor

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

*a) Preparación del caldo de cultivo*

Siguiendo las instrucciones del fabricante se preparó 250 ml de TSB (Trypticase Soya Broth) adicionado con el 2% de Tween 20, con el objetivo de que los aceites esenciales formen una emulsión con el caldo de cultivo. Se procedió a distribuir 1ml del caldo en 250 tubos de ensayo con tapa rosca (13x100 mm) y se esterilizó en un autoclave marca Tuttnauer 387OM, a 121°C durante 15 minutos.

Una vez esterilizados los tubos de ensayo con TSB se procedió a formar series de diez tubos y se los etiquetó con información importante como: fecha, microorganismo a inocular y numero de tubo (del 1 al 10). Este proceso se realizó por duplicado para cada aceite esencial a evaluar.

Aparte, en un tubo de ensayo vacío y estéril (etiquetado como tubo 0), se colocó 2 ml del aceite esencial a evaluar. Seguidamente, con la ayuda de una pipeta desechable estéril, se tomó 1 ml del contenido del tubo 0, se transfirió al tubo 1 y se homogenizó. Se repitió la operación con el tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 10. Como se ha mencionado, el procedimiento se realizó por duplicado para cada aceite esencial.

*b) Preparación del inóculo bacteriano*

En varios tubos de ensayo, a partir de las cepas ATCC activadas en los pasos anteriores, se preparó un cultivo de cada una de las cepas a utilizarse en 5 ml del medio Trypticase Soya Broth y se incubó a 37°C durante 24 horas para *S. pyogenes* y

48 horas para *S. mutans*. Transcurrido el tiempo de incubación, en una centrífuga marca Selecta, se centrifugaron los tubos de ensayo a 3500 revoluciones por minuto (rpm), durante 20 minutos. Inmediatamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido en 4 ml de solución fisiológica estéril (NaCl 0,9%). (Ver Fotografía 1)

Seguidamente, en un tubo con 10 ml de solución fisiológica estéril, se adicionó el inóculo obtenido en el paso anterior, y se reguló la densidad óptica hasta obtener una absorbancia similar a 0.200 a una longitud de onda de 655 nm; de esta manera se obtiene un inóculo bacteriano equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

Las lecturas de turbidez del inóculo se realizó en el Espectrofotómetro UV/Visible marca Shimatzu Modelo MINI 1240.

#### *c) Inoculación de microorganismos*

Una vez obtenidos los tubos seriados con caldo de cultivo y diferentes concentraciones de aceite esenciales se procedió a inocular los microorganismos. Para el caso de *S. pyogenes* se inoculó 10  $\mu$ L de la suspensión bacteriana obtenida anteriormente en cada tubo de ensayo de tal manera que, se inoculan  $1 \times 10^6$  ufc/ml. Para *S. mutans*, se inoculó 1000  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en cada tubo de ensayo de tal manera que, se inoculan  $1 \times 10^8$  ufc/ml.

La diferencia en el volumen de suspensión inoculada para cada cepa radica en que *S. pyogenes* muestra un buen crecimiento in vitro, por su parte, *S. mutans* es un microorganismo exigente y en una prueba previa, al inocular 10  $\mu$ L de la suspensión bacteriana, no se presencié crecimiento, por esta razón se decidió aumentar el volumen y por lo tanto la cantidad de UFC a inocular.

#### *d) Incubación*

Posteriormente de la inoculación de las suspensiones bacterianas en cada tubo, se procedió a incubar los tubos en una estufa marca Shel Lab a 37°C. Los tubos con *S.*

*pyogenes* se incubaron durante 24 horas mientras que los tubos con *S. mutans* se incubaron durante 48 horas.

e) *Siembra en BHIA* (Brain and Heart Infusion Agar)

Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, con la ayuda de un hisopo estéril, se tomó una muestra de cada tubo y se sembró en cajas petri que contenían BHIA, preparado según las indicaciones del fabricante. Se incubaron las cajas en una estufa marca Shel Lab a 37°C. Las cajas que contenían las muestras de *S. pyogenes* se incubaron durante 24 horas mientras que las de *S. mutans* se incubaron durante 48 horas (Ver Fotografía 2). Cumplido el tiempo de incubación se observaron las cajas en las cuales no existe crecimiento bacteriano y se define la CMB de cada aceite frente a cada microorganismo.

La mayoría de autores recomiendan el uso de agar Muller Hinton suplementado con el 5% de sangre de cordero para el crecimiento de todas especies de estreptococos sin embargo, debido a la complejidad en la obtención de este medio de cultivo, se escogió el medio de cultivo BHIA ya que, existen estudios que indican que el agar BHIA permite el crecimiento adecuado tanto de *S. mutans* como de *S. pyogenes*.<sup>126</sup>

## **6.6 Evaluación sensorial de enjuagues bucales comerciales**

Con el objetivo de orientar la formulación del colutorio hacia el enjuague de mayor aceptación por parte de los consumidores, se procedió a realizar una evaluación sensorial del tipo hedónico y de preferencia para valorar las características: sabor, sensación de irritación y sensación de frescura que producían los diferentes enjuagues bucales comerciales usados como muestras: Listerine, Encident, Oraldine, Colgate Plax. (Ver Fotografía 3)

Para esto, se escogió la Prueba de Nivel de Agrado o también llamada Prueba Hedónica cuyo objetivo es “localizar el nivel de agrado o desagrado que provoca una

---

<sup>126</sup> MEDINA, Rosalba y otros, “Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “in vitro””, *Revista Nova*, Vol 3, N° 3, ISSN 1794-2470, Colombia, Enero-Junio 2005, pp 25-30

muestra específica.”<sup>127</sup> La evaluación se realizó con la participación de 80 personas de una edad promedio de 22 años y se realizó en tres etapas: en el primer impacto (cuando se coloca el enjuague en la boca), durante la evaluación (mientras se realizan buchadas) y al final de la evaluación (cuando se desecha el enjuague de la boca). (Ver Fotografía 4).

Para el correcto desenvolvimiento de esta evaluación, se proporcionó a los participantes las respectivas instrucciones (Ver Anexo 3) así como un formato de calificación (Ver Anexo 4). Además, cada juez tenía a su disposición un vaso con agua para enjuagar la boca, un vaso vacío para desechar los enjuagues y galletas soda para neutralizar los sabores luego de probar cada enjuague.

Se distribuyó 10 ml de cada enjuague bucal en vasos plásticos desechables que contenían una etiqueta blanca en donde se colocó el código de la muestra (número aleatorio de tres dígitos), el número de consumidor y el código asignado a cada enjuague bucal (A, B, C o D). El uso de códigos evita que los jueces distingan los enjuagues bucales, de esta manera se disminuyen las posibles influencias personales y sesgos en las calificaciones.

El orden de presentación de las muestras se realizó de acuerdo a un Modelo Balanceado; es decir, el número de veces que la primera muestra aparece en el primer lugar en la prueba, debe ser igual al número de veces que la segunda muestra aparece en el primer lugar, y así sucesivamente, de manera que las muestras ocupen todos los lugares el mismo número de veces (permutaciones).<sup>128</sup> (Ver Anexo 5)

## **6.7 Formulación del colutorio con aceite esencial de la hoja de ishpingo y clavo de olor**

Una vez escogidos los aceites esenciales con los cuales se iba a trabajar (tomando en cuenta la CMB más baja) y habiendo establecido un prototipo de preferencia sensorial, se procedió a formular el colutorio. Dentro de la fórmula se consideraron las materias primas más importantes: un tensioactivo o detergente (lauril éter sulfato

---

<sup>127</sup> PEDRERO, Daniel y PANGBORN, Rose, *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*, Primera Edición, Editorial Alhambra Mexicana, México D.F., 1989, p. 105

<sup>128</sup> Ídem, p. 33

de sodio), sustancias humectantes (sorbitol y glicerina), un saborizante (sabor menta), un edulcorante (sacarina sódica), colorantes (verde menta y amarillo) y los principios activos (principal: aceite esencial de la hoja de ishpingo, secundario: aceite esencial de clavo de olor). Se decidió no usar conservantes ya que los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana de manera que no debería existir crecimiento bacteriano en la fórmula, por otro lado, la fórmula contiene alcohol, lo que también ayuda a que no proliferen las bacterias en la fórmula. Las concentraciones utilizadas de cada materia prima están dentro de los rangos sugeridos por la bibliografía. Se elaboraron dos formulaciones, una con mayor y otra con menor contenido alcohólico. En las Tablas 6 y 7, se presenta la fórmula unitaria para una presentación de 80 ml:

<b>Tabla 6. Fórmula Unitaria Colutorio A</b>		
<b>Sustancia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Cantidad</b>
Emal 70 (Lauril éter sulfato de sodio)	3.75%	3 g
Glicerina	18.38%	14.7 g
Sorbitol	5.63%	4.5 g
Sabor Menta	4%	3.2 g
Sacarina sódica	0.04%	0.032 g
Alcohol 96°	12.5%	10 ml
Aceite esencial de la hoja de ishpingo	0.26%	0.21 ml
Aceite esencial de clavo de olor	1.56%	1.25 ml
Colorante verde	-	1 gota
Colorante amarillo	-	1 gota
Agua	33.88%	c.s.p.80 ml
<b>Total</b>	<b>100%</b>	

Fuente: La autora

<b>Tabla 7. Fórmula Unitaria Colutorio B</b>		
<b>Sustancia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Cantidad</b>
Emal 70 (Lauril éter sulfato de sodio)	3.75%	3 g
Glicerina	18.38%	14.7 g
Sorbitol	5.63%	4.5 g
Sabor Menta	4%	3.2 g
Sacarina sódica	0.04%	0.032 g
Alcohol 96°	6.25%	5 ml
Aceite esencial de la hoja de ishpingo	0.26%	0.21 ml
Aceite esencial de clavo de olor	1.56%	1.25 ml
Colorante verde	-	1 gota
Colorante amarillo	-	1 gota
Agua	33.88%	c.s.p. 80 ml
<b>Total</b>	100%	

Fuente: La autora

### **6.8 Elaboración del colutorio con aceite esencial de la hoja de ishpingo y aceite esencial de clavo de olor**

Para elaborar el colutorio, se siguieron los siguientes pasos:

1. Pesar y medir todos los ingredientes de la fórmula.
2. Mezclar el lauril éter sulfato de sodio junto con la glicerina, el sorbitol y el sabor menta en un agitador magnético a 800 rpm durante 10 minutos.
3. Reunir el alcohol con los principios activos (aceites esenciales) y agitar hasta que se disuelvan completamente; una vez logrado esto, añadir lentamente a la mezcla anterior y aumentar la velocidad de agitación a 1000 rpm.
4. Añadir lentamente las  $\frac{3}{4}$  partes del disolvente (agua).
5. Adicionar los componentes minoritarios: sacarina sódica y colorante y agitar durante 5 minutos hasta su completa disolución.
6. Completar la formulación con el resto del disolvente hasta el volumen total especificado en la fórmula.

7. Envasar y etiquetar el colutorio en un frasco de vidrio.
8. Reposar el colutorio por 24 horas para que desaparezca la espuma.
9. Realizar los controles de calidad respectivos: organolépticos y físico-químicos y microbiológicos.

### **6.9 Evaluación de la actividad antibacteriana de los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales por el método de difusión en medio sólido**

Se siguió la metodología siguiente:

- a. Se prepararon los inóculos de las bacterias de la misma manera que los utilizados para obtener la CMB de los aceites esenciales. (Cfr. Supra p. 48-49)
- b. Se sumergió un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana y se eliminó el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo evitando así el exceso de inóculo.
- c. Se inoculó la superficie de placas de agar BHIA (por ser el que ofrece un crecimiento adecuado tanto de *S. mutans* como de *S. pyogenes*) con el hisopo pasándolo por toda la superficie en tres direcciones. Se dejaron secar las placas por 5 minutos.
- d. Utilizando unas pinzas estériles se colocaron sobre las cajas petri discos de papel filtro (6mm de diámetro) con 25µl de las siguientes muestras: Listerine, Colgate Plax, Encident, Oraldine, Colutorio A, Colutorio B, Blanco Positivo 1 (aceite esencial de la hoja de ishpingo), Blanco Positivo 2 (aceite esencial de clavo de olor), Blanco Negativo (fórmula del Colutorio A sin aceites esenciales). Para que las muestras difundan en el medio de cultivo se dejaron reposar las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- e. En una estufa marca Shel Lab se incubaron las placas en posición invertida a 37°C durante 24 horas para *S. pyogenes* y 48 horas para *S. mutans*.
- f. Transcurrido este tiempo, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición con un pie de rey y se apuntaron los resultados.
- g. Todo el procedimiento anterior se realizó por quintuplicado tanto para *S. mutans* como para *S. pyogenes*. La bibliografía señala que el procedimiento

se debe hacer mínimo por cuadruplicado con el fin de obtener un error menor al 10%.<sup>129</sup>

### **6.10 Estabilidad del colutorio elaborado**

El estudio de estabilidad fue realizado con el Colutorio B puesto que contiene una menor concentración de alcohol y es menos irritante que el Colutorio A.

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada ya que este tipo de estudio permite conocer en corto tiempo, la evolución de las características organolépticas, fisico-químicas y microbiológicas del producto. Además, se escogió este tipo de estudio ya que, puede ser empleado en la fase de desarrollo del producto utilizándose lotes producidos en escala laboratorial, que es lo que contempla esta investigación.<sup>130</sup>

Se preparó un lote de 2000 ml y se envasó el producto en frascos de polietileno de 40 ml de capacidad (Ver Fotografía 5). Se escogió este tipo de envase puesto que es uno de los materiales más utilizado por las marcas comerciales. De acuerdo a lo recomendado por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria del Brasil, las muestras se sometieron a diversas condiciones de almacenamiento. (Ver Tabla 8)

<b>Tabla 8. Protocolo del Estudio de Estabilidad Acelerada</b>
--

---

<sup>129</sup> CYTED, *Manual de Técnicas de Investigación*, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma X: Química Fina Farmacéutica, Proyecto X-1: Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región, 1995, p. 69

<sup>130</sup> AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA, *Guía de estabilidad de productos cosméticos*, Serie Calidad en Cosméticos, Segunda Edición, Volumen 1, Brasilia, Mayo 2005, ISBN – 85-88233-15-0, pp 1-52

<b>Condiciones de almacenamiento</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Período establecido</b>	<b>Frecuencia de análisis</b>
Estufa: 40±2 °C	12	60 días	Tiempo cero, 24 horas, 7, 15, 30, 60
Nevera: 5±2 °C	12	60 días	Tiempo cero, 24 horas, 7, 15, 30, 60
Exposición a radiación luminosa: fuente de luz ultravioleta	12	60 días	Tiempo cero, 24 horas, 7, 15, 30, 60

Fuente: La autora, con base en *Guía de estabilidad de productos cosméticos*

Se escogieron diferentes parámetros a evaluar durante el tiempo de duración del estudio. (Ver Tabla 9). Se consideraron aceptables los cambios que se encuentren dentro del ±2% de variación.<sup>131</sup> Para el contenido del principio activo (aceite esencial de la hoja de ishpingo) se aceptarán cambios hasta de un ±10% de variación, considerando que no se trata de un producto farmacéutico sino más bien cosmético.

<b>Tabla 9. Parámetros a evaluar en el Estudio de Estabilidad Acelerada</b>	
<b>Características organolépticas</b>	Aspecto, color, olor, sabor,
<b>Características físico-químicas</b>	pH, densidad
<b>Características microbiológicas</b>	Mohos y levaduras, aerobios totales, coliformes totales.
<b>Material de Acondicionamiento (Envase)</b>	Deformación
<b>Principio Activo</b>	Variación en el contenido de aceite esencial de la hoja de ishpingo (A1)

Fuente: La autora

La evaluación de las características organolépticas, físico químicas y del material de acondicionamiento se realizó de manera sensorial, es decir, usando los órganos de los sentidos. La evaluación de las características microbiológicas se realizó utilizando placas Petrifilm marca 3M para el conteo de coliformes totales, aerobios totales y mohos y levaduras. Para evaluar el contenido del aceite esencial de la hoja de ishpingo se pesaron en un balón aforado entre 21.3 y 22.5 mg del colutorio y se aforó a 5 ml con éter de petróleo. De esta dilución se tomó 1ml y se aforó nuevamente a 5 ml de éter de petróleo; se tomó 2 µL de esta muestra y se inyectó en el equipo de GC-MS. Las condiciones de trabajo del equipo fueron las mismas que las que se

<sup>131</sup> La Norma Oficial Mexicana Nom-073-Ssa1-2005, Estabilidad de Fármacos y Medicamentos, establece que se consideran cambios significativos durante la estabilidad acelerada al 5% de la variación de los valores iniciales del principio activo y/o especificaciones de apariencia y propiedades físicas

ocuparon en la identificación del aceite esencial de la hoja de ishpingo (Cfr. Supra 47)

### **6.11 Perfil Organoléptico del Colutorio elaborado**

Se realizó la *Prueba de Perfilamiento*, cuyo objetivo es analizar las características organolépticas de un producto y la relación de ellos con un producto estándar; en este caso, el enjuague bucal que en la prueba hedónica y de preferencia realizada inicialmente, tuvo mejor aceptación. Esta prueba se realiza de manera que se genera el mayor contenido de información posible acerca de un producto.<sup>132</sup>

La prueba se llevó a cabo con un panel sensorial formado por doce jueces, 5 hombres y 7 mujeres, de una edad promedio de 21.08 años (Ver Anexo 6, Fotografía 6). Previamente, se siguió un programa de entrenamiento mediante el cual los jueces se capacitaron en:

- Adquirir conocimientos básicos sobre la Evaluación Sensorial y el manejo de Buenas Prácticas de Evaluación así como en los sesgos y errores propios de la Evaluación Sensorial.
- Pruebas de sabores básicos (dulce, salado, amargo y ácido)
- Pruebas de aromas (para distinguir ishpingo, clavo de olor, menta, alcohol, canela, etc.)
- Pruebas de ordenamiento de sabores considerados predominantes según la formulación
- Pruebas descriptivas

Posteriormente de la etapa de entrenamiento, se procedió a realizar la Prueba del Perfil del Colutorio, la cual, incluyó evaluar características como: aroma, sabor, sabor residual y formación de espuma así como el grado de intensidad de cada factor calificado en una escala del 1-10 (con la posibilidad de usar decimales).

---

<sup>132</sup> PEDRERO, Daniel y PANGBORN, Rose, Op. Cit. p. 87

Se realizaron dos sesiones evaluativas utilizando un Modelo Experimental Balanceado en el que se presentaban dos muestras, muestra 1: Colgate Plax y muestra 2: Colutorio elaborado, cuidando que cada muestra sea evaluada el mismo número de veces en todos los órdenes de presentación. (Ver Anexo 7)

Se proporcionó a cada juez la muestra (10 ml) en un vaso desechable, un vaso con agua, una galleta soda y el formato de evaluación (Ver Anexo 8).

## **7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

### **7.1 Identificación de los microorganismos seleccionados para la investigación**

La prueba de la tinción Gram resultó positiva para ambos microorganismos: *S. mutans* y *S. pyogenes*, se observaron formas cocáceas dispuestas en cadenas típicas de estos microorganismos.

La prueba de la catalasa fue negativa tanto para *S. mutans* como para *S. pyogenes*, resultado característico para estos microorganismos.

### **7.2 Análisis organoléptico y físico-químico de los aceites esenciales**

Los aceites A1 y A4 demuestran propiedades organolépticas así como físico-químicas adecuadas y muy similares a las detalladas en la ficha técnica de referencia de este producto que comercializa Amazon Aroma (Ver Anexo 9). Por otra parte, los aceites A2 y A3, a pesar de tener color, sabor y apariencia igual a los aceites A1 y A5, tienen un olor diferente. Además, los aceites A2 y A3 difieren de los aceites A1 y A4 en la solubilidad en alcohol al 96°, la densidad y el índice de refracción es ligeramente inferior. (Ver Tablas 10 y 11)

La Real Farmacopea Española (Versión 2002), señala que el aceite esencial de clavo de olor debería tener una densidad entre 1.030 y 1.063; el índice de refracción debería estar entre 1.528 y 1.537. Estos datos varían mínimamente con los de la muestra A5 lo que nos indica que este aceite comercializado por Laboratorios Luque no es completamente puro. (Ver Tablas 10 y 11)

<b>Tabla 10. Propiedades Organolépticas de los Aceites Esenciales</b>					
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>
<b>Color</b>	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Marrón
<b>Olor</b>	A ishpingo	A pino	A pino	A ishpingo	A clavo de olor
<b>Sabor</b>	Picante	Picante	Picante	Picante	Picante
<b>Apariencia</b>	Líquido Transparente	Líquido Transparente	Líquido Transparente	Líquido Transparente	Líquido Transparente

Fuente: La autora

<b>Tabla 11. Propiedades Físico-Químicas de los Aceites Esenciales</b>					
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>
<b>Densidad (g/ml)</b>	0.9547	0.9066	0.9504	0.9540	0.9949
<b>Índice de refracción</b>	1.517	1.479	1.504	1.517	1.440
<b>Solubilidad en agua</b>	Insoluble, flota sobre el agua	Insoluble, se hunde en el agua			
<b>Solubilidad en alcohol 96°</b>	Soluble	Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble

Fuente: La autora

Los aceites esenciales A1 y A4 luego de ser analizados por GC-MS tuvieron el perfil cromatográfico del aceite esencial de la hoja de ishpingo, el compuesto que se encontraba en mayor proporción fue el cariofileno. Los aceites esenciales A2 y A3 fueron descartados para la elaboración del colutorio puesto que, su perfil cromatográfico no coincide con el del aceite esencial de la hoja de ishpingo; el eucaliptol es el componente que se encontraba en mayor proporción.

### 7.3 Determinación in-vitro de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor mediante el método de dilución en medio líquido

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la CMB del A1 para *S. mutans* y *S. pyogenes*. Una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA se observa ausencia de crecimiento en concentraciones del aceite esencial superiores a 0.19% para *S. pyogenes* y 0.52% para *S. mutans*, concentraciones que corresponden a los tubos 9 y 6 respectivamente.

<b>Dilución</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 2</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 2</b>
0	100%	-	-	100%	-	-
1	50%	-	-	33.33%	-	-
2	25%	-	-	16.67%	-	-
3	12.5%	-	-	8.33%	-	-
4	6.25%	-	-	4.17%	-	-
5	3.13%	-	-	2.08%	-	-
6	1.56%	-	-	1.04%	-	-
7	0.78%	-	-	0.52%	+	+
8	0.39%	-	-	0.26%	+	+
9	0.19%	+	+	0.13%	+	+
10	0.097%	+	+	0.07%	+	+

Fuente: La autora

-: ausencia de crecimiento

+: crecimiento

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la CMB del A2 para *S. mutans* y *S. pyogenes*. Una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA se observa ausencia de crecimiento en concentraciones del aceite esencial superiores a 0.26% para *S. mutans* y 0.39% para *S. pyogenes* concentraciones que corresponden a los tubos 7 para ambos casos.

<b>Dilución</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 2</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 2</b>
0	100%	-	-	100%	-	-
1	50%	-	-	33.33%	-	-
2	25%	-	-	16.67%	-	-
3	12.5%	-	-	8.33%	-	-
4	6.25%	-	-	4.17%	-	-
5	3.13%	-	-	2.08%	-	-
6	1.56%	-	-	1.04%	-	-
7	0.78%	-	-	0.52%	-	-
8	0.39%	+	+	0.26%	+	+
9	0.19%	+	+	0.13%	+	+
10	0.097%	+	+	0.07%	+	+

Fuente: La autora

-: ausencia de crecimiento

+: crecimiento

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la CMB del A3 para *S. mutans* y *S. pyogenes*. Una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA se observa ausencia de crecimiento en concentraciones del aceite esencial superiores a 2.08% para *S. mutans*, concentración que corresponde al tubo 4. Para *S. pyogenes* se observa ausencia de crecimiento aún a la concentración más baja del aceite esencial 0.097%.

<b>Tabla 14. Concentración Mínima Bactericida A3</b>						
<b>Dilución</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 2</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 2</b>
0	100%	-	-	100%	-	-
1	50%	-	-	33.33%	-	-
2	25%	-	-	16.67%	-	-
3	12.5%	-	-	8.33%	-	-
4	6.25%	-	-	4.17%	-	-
5	3.13%	-	-	2.08%	+	+
6	1.56%	-	-	1.04%	+	+
7	0.78%	-	-	0.52%	+	+
8	0.39%	-	-	0.26%	+	+
9	0.19%	-	-	0.13%	+	+
10	0.097%	-	-	0.07%	+	+

Fuente: La autora

-: ausencia de crecimiento

+: crecimiento

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la CMB del A4 para *S. mutans* y *S. pyogenes*. Una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA se observa ausencia de crecimiento en concentraciones del aceite esencial superiores a 0.13% para *S. mutans*, concentración que corresponde al tubo 8. Para *S. pyogenes* se observa ausencia de crecimiento aún a la concentración más baja del aceite esencial 0.097%.

<b>Tabla 15. Concentración Mínima Bactericida A4</b>						
<b>Dilución</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Tubo 2</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 1</b>	<b><i>S. mutans</i> Tubo 2</b>
0	100%	-	-	100%	-	-
1	50%	-	-	33.33%	-	-
2	25%	-	-	16.67%	-	-
3	12.5%	-	-	8.33%	-	-
4	6.25%	-	-	4.17%	-	-
5	3.13%	-	-	2.08%	-	-
6	1.56%	-	-	1.04%	-	-
7	0.78%	-	-	0.52%	-	-
8	0.39%	-	-	0.26%	-	-
9	0.19%	-	-	0.13%	+	+
10	0.097%	-	-	0.07%	+	+

Fuente: La autora

-: ausencia de crecimiento

+: crecimiento

En la Tabla 16 se muestran los resultados de la CMB del A5 para *S. mutans* y *S. pyogenes*. Una vez que se sembraron alícuotas de cada tubo en cajas petri con BHIA se observa ausencia de crecimiento en concentraciones del aceite esencial superiores a 0.78% para *S. pyogenes* y 0.13% para *S. mutans*, concentraciones que corresponden a los tubos 6 y 8 respectivamente.

<b>Tabla 16. Concentración Mínima Bactericida A5</b>
--

<b>Dilución</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b>S. pyogenes Tubo 1</b>	<b>S. pyogenes Tubo 2</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b>S. mutans Tubo 1</b>	<b>S. mutans Tubo 2</b>
0	100%	-	-	100%	-	-
1	50%	-	-	33.33%	-	-
2	25%	-	-	16.67%	-	-
3	12.5%	-	-	8.33%	-	-
4	6.25%	-	-	4.17%	-	-
5	3.13%	-	-	2.08%	-	-
6	1.56%	-	-	1.04%	-	-
7	0.78%	+	+	0.52%	-	-
8	0.39%	+	+	0.26%	-	-
9	0.19%	+	+	0.13%	+	+
10	0.097%	+	+	0.07%	+	+

Fuente: La autora

-: ausencia de crecimiento

+: crecimiento

Con los resultados expuestos, se descartan el uso de los aceites esenciales A2 y A3 para la formulación y elaboración de nuestros colutorios puesto que estos aceites como se ha mencionado, presentan una composición química diferente a la del aceite esencial de la hoja de ishpingo, además, la CMB de estos aceites es superior a las de los aceites A1 y A4..

Entre los aceites A1 y A4, se escogió el segundo puesto que presenta una CMB inferior tanto para *S. mutans* como para *S. pyogenes*, a escala industrial esto es muy importante ya que se reducen costos de producción y se aprovechan recursos. Finalmente, se escogió A5 ya que era el único aceite de clavo de olor que disponíamos.

#### **7.4 Evaluación sensorial de enjuagues bucales comerciales**

La evaluación sensorial dio como resultado que el enjuague bucal Colgate Plax es el preferido por los evaluadores, por tal razón, este enjuague será tomado como estándar o prototipo en la elaboración del colutorio.

A los evaluadores les gustó el sabor a menta de este enjuague bucal, por tal razón será imprescindible tomar en cuenta esta variable. Además, es importante que nuestro enjuague no sea muy irritante, para esto, trataremos de usar alcohol y los aceites esenciales en la mínima concentración posible (CMB).

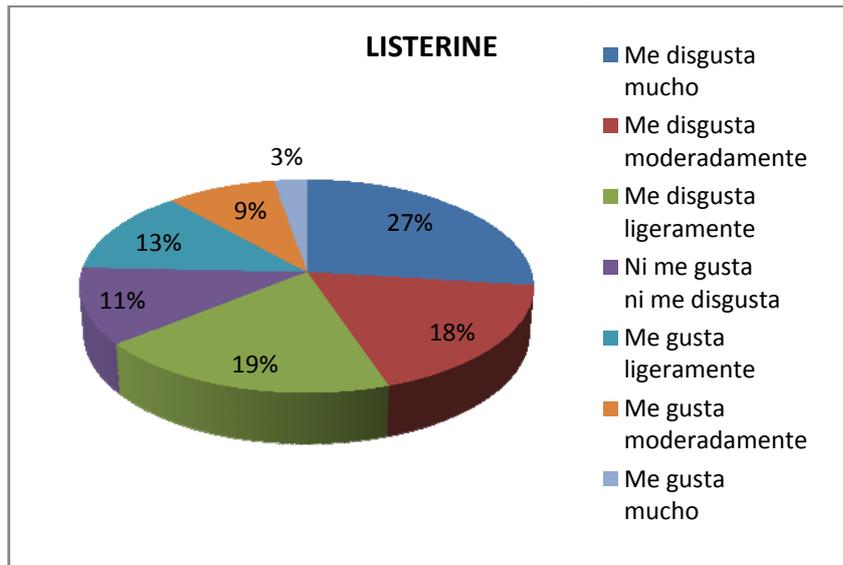
A continuación se presentarán los gráficos correspondientes a las calificaciones hedónicas generales que cada enjuague bucal recibió en la evaluación sensorial y la preferencia de cada evaluador. En los Anexos 10-21, se presentan las calificaciones hedónicas de cada enjuague bucal al primer impacto, durante las buchadas y al final de la evaluación.

#### **7.4.1 Listerine**

El 27% de los participantes de la evaluación sensorial, es decir, 22 personas declararon que el enjuague bucal Listerine les disgusta mucho debido a que, según mencionaron es un enjuague muy irritante, picante, provoca un cierto grado de amortiguamiento en la boca y tiene mal sabor. El 11% de los evaluadores, se mantienen en un punto neutro, es decir, que Listerine ni les gusta ni les disgusta. Sólo el 3% de los evaluadores dicen que Listerine les gusta mucho ya que la

sensación de frescura que éste proporciona permanece luego de su uso. (Ver Gráfico 1)

**Gráfico 1.** Calificación General de Listerine



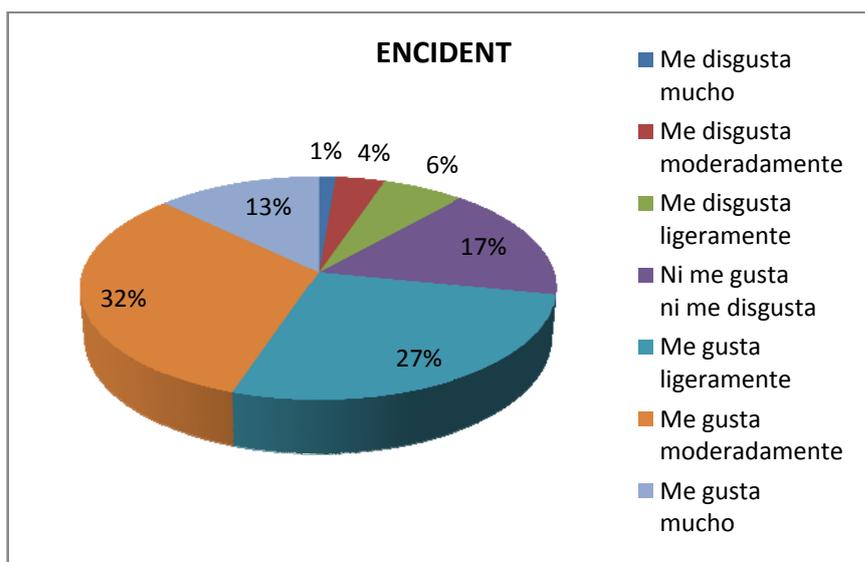
Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

#### 7.4.2 Encident

La mayoría de evaluadores, el 32%, es decir 26 personas mencionaron que Encident les gusta moderadamente. Las razones para esta respuesta es que este enjuague según mencionaron, tiene un sabor muy suave pero la sensación de frescura luego de uso es pobre, además, los evaluadores señalaron que al final de la evaluación persiste un sabor metálico y amargo en la boca. El 17% de los evaluadores, 14 personas, están de acuerdo en que las características de Encident ni les gusta ni les disgusta. Sólo el

1% de los evaluadores, es decir, 1 evaluador, respondió que este enjuague bucal le disgusta mucho. (Ver Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Calificación General de Encident

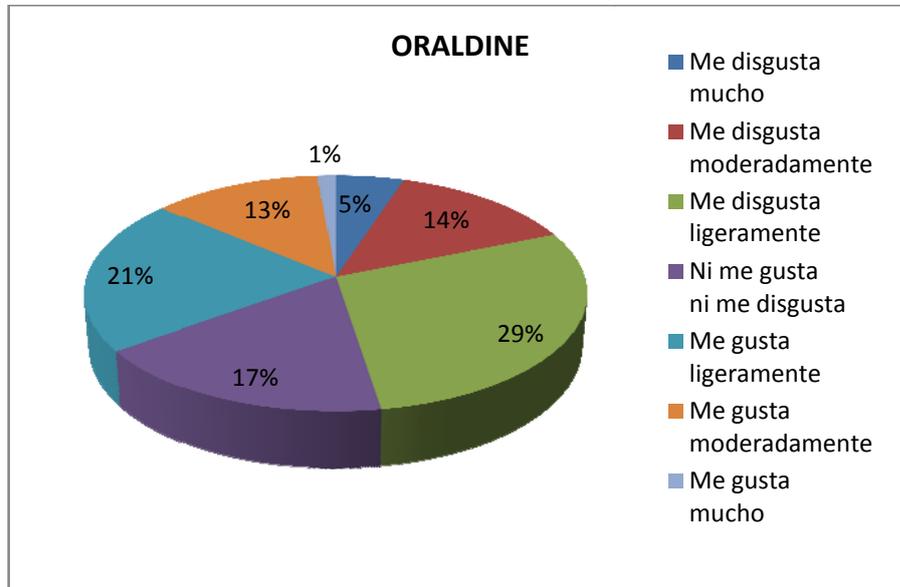


Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

### 7.4.3 Oraldine

La mayoría de evaluadores, el 29%, es decir 23 personas, respondieron que las propiedades de Oraldine ni les gusta ni les disgusta. Sólo el 1%, es decir, 1 persona declaró que este enjuague le gusta mucho. Para 4 personas, es decir el 5% de los evaluadores, este enjuague les disgusta mucho. Los evaluadores mencionan que este enjuague tiene un sabor desagradable, es un poco irritante y proporciona una baja sensación de frescura luego de su uso. (Ver Gráfico 3)

**Gráfico 3.** Calificación General de Oraldine



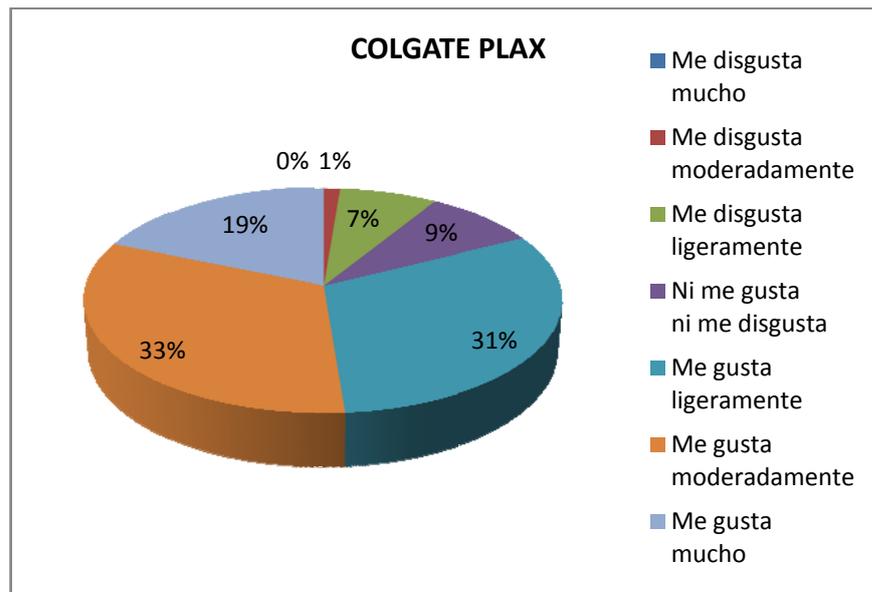
Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

#### **7.4.4 Colgate Plax**

Para el 33% de los evaluadores, es decir, 26 personas, el enjuague Colgate Plax les gusta moderadamente. A ninguna persona le disgusta mucho este enjuague bucal y al 19% de los evaluadores, es decir, 15 personas, Colgate Plax les gusta mucho. Algunas de las explicaciones para estos resultados serían, según los evaluadores: Colgate Plax tiene un equilibrio en sus cualidades, posee un agradable sabor a menta, la sensación de irritación es aceptable y la sensación de frescura que proporciona

durante y luego de su uso permanece incluso luego de comer la galleta soda. (Ver Gráfico 4).

**Gráfico 4.** Calificación General de Colgate Plax

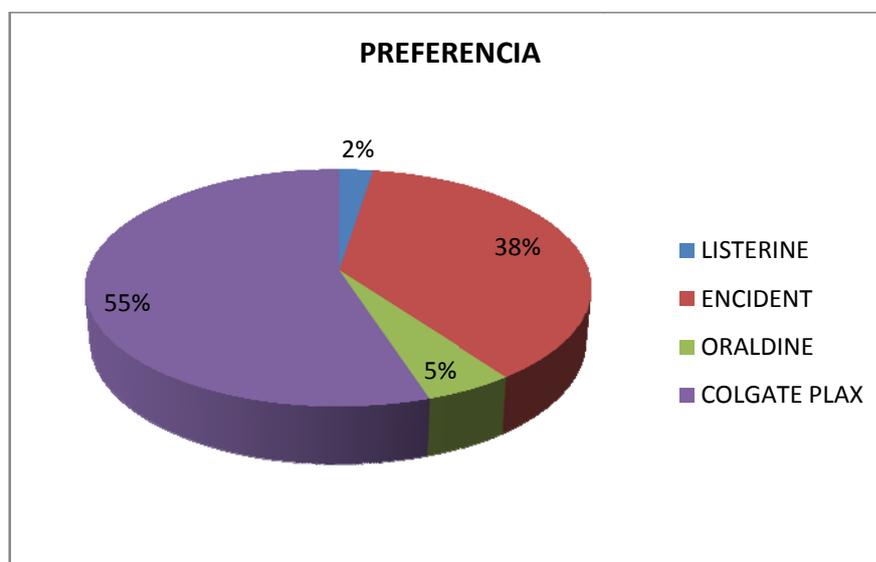


Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

#### 7.4.5 Preferencia

Al final de la evaluación, se pidió a los evaluadores que, tomando en cuenta las cualidades de sabor, sensación de irritación y sensación de frescura, señalen que enjuague bucal preferirían comprar y usarlo. Más de la mitad de los evaluadores, el 55%, es decir, 44 personas, señalaron que preferirían el enjuague bucal Colgate Plax. 30 personas, es decir el 38% de los evaluadores, preferirían Encident. El 5%, es decir, 4 personas preferirían Oraldine. Tan solo el 2%, es decir, 2 personas preferirían Listerine. (Ver Gráfico 5)

**Gráfico 5.** Preferencia de los enjuagues bucales de los participantes de la evaluación sensorial



Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial de preferencia

### 7.5 Formulación y elaboración de los colutorios

En la Tabla 17 se presentan las características organolépticas, físico-químicas y microbiológicas de los colutorios elaborados y de los enjuagues bucales comerciales.

En cuanto al color, los colutorios elaborados tienen una tonalidad verde limón, diferente al resto de enjuagues comerciales. El olor difiere del resto de enjuagues usados como muestras. El sabor es picante, parecido al Listerine, sin embargo, los

Colutorios A y B presentan un sabor característico a ishpingo. La apariencia es como la del resto de enjuagues comerciales: líquido transparente.

Las características físico-químicas de los Colutorios elaborados no difieren significativamente de las presentadas por los enjuagues muestras. Su densidad e índice de refracción son muy cercanos a los valores presentados por Colgate Plax. El pH es la única característica en las que los Colutorios A y B difieren significativamente con Colgate Plax, ya que, presentan, al igual que Encident, un pH 8 (ligeramente básico), mientras que, Colgate Plax tiene un pH 6 (ligeramente ácido).

Tanto los Colutorios A, B y los enjuagues muestras están libre de contaminación microbiana (aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras). Esto se debe, sin duda, a que todos estos enjuagues contienen sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de cualquier tipo de organismo.

**Tabla 17. Características de los Colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales**

		<b>Colutorio A</b>	<b>Colutorio B</b>	<b>Listerine</b>	<b>Encident</b>	<b>Oraldine</b>	<b>Colgate Plax</b>
<b>Organolépticas</b>	<b>Color</b>	Verde limón	Verde limón	Amarillo	Rosado	Rojo	Verde
	<b>Olor</b>	Ishpingo y menta	Ishpingo y menta	Alcohólico	Menta Suave	Alcohólico	Mentolado
	<b>Sabor</b>	Picante, ishpingo	Picante, ishpingo	Picante	Mentolado	Amargo	Dulce, mentolado
	<b>Apariencia</b>	Líquido transparente					
<b>Físico-químicas</b>	<b>Densidad</b>	1.0507	1.0615	0.9682	1.0271	0.9916	1.0426
	<b>Índice de refracción</b>	1.382	1.382	1.352	1.348	1.345	1.364
	<b>pH</b>	8	8	4	8	4	6
<b>Microbiológicas</b>	<b>Aerobios totales</b>	0 UFC					
	<b>Coliformes totales</b>	0 UFC					
	<b>Mohos y levaduras</b>	0 UFC					

Fuente: La autora, con base a evaluación de características

## **7.6 Actividad antibacteriana de los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales por el método de difusión en medio sólido**

En la Tabla 18, se muestran los resultados de los halos de inhibición (mm) que mostraron los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales usados como muestras. (Ver Fotografías 7-8)

Los resultados obtenidos muestran que Listerine no es capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* ni de *S. pyogenes*, ya que no se observa ningún halo de inhibición. Estos datos concuerdan con la investigación realizada por Valentina Camejo.<sup>133</sup>

Tanto el Colutorio A como el B, presentan un halo de inhibición promedio de 0.88 mm frente a *S. mutans*. El Colutorio A muestra un halo de inhibición promedio de 1 mm frente a *S. pyogenes* mientras que el Colutorio B, para este mismo microorganismo muestra un halo de inhibición promedio de 1.02 mm.

Encident muestra un halo de inhibición promedio de 3.22 mm frente a *S. mutans*, y 4.88 mm frente a *S. pyogenes*. Estos halos, son superiores frente a los presentados por los Colutorios A y B.

Oraldine presenta un halo de inhibición promedio de 0.25 mm frente a *S. mutans* y 0.36 mm frente a *S. pyogenes*. Los halos de inhibición de los Colutorios A y B son superiores a estos.

Colgate Plax exhibe un halo de inhibición promedio de 0.17 mm frente a *S. mutans* y 14.68 mm frente a *S. pyogenes*. Los Colutorios A y B presentan un halo superior frente a *S. mutans* pero al mismo tiempo inferior para *S. pyogenes*.

El blanco negativo no presenta ningún halo de inhibición lo que demuestra que efectivamente los aceites esenciales de la hoja de ishpingo y clavo de olor son las

---

<sup>133</sup> CAMEJO, Valentina, *Sensibilidad in vitro de Streptococcus mutans a sanguinaria, compuesto fenólico y clorhexidina*, Acta Odontológica Venezolana, Vol 37, N° 2, Venezuela, 1999, formato pdf, disponible en Internet: [http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/sensibilidad\\_in\\_vitro\\_streptococcus\\_mutans\\_a\\_sanguinarina\\_compuesto\\_fenolico\\_clorhexidina.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/sensibilidad_in_vitro_streptococcus_mutans_a_sanguinarina_compuesto_fenolico_clorhexidina.asp)

sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos ya que, como se mencionó con anterioridad, se usó como blanco negativo la misma fórmula del Colutorio A (con mayor contenido alcohólico) pero sin adicionar los aceites esenciales.

El blanco positivo 1 (aceite esencial A4 al 100%) mostró un halo de inhibición promedio de 0.86 mm para *S. mutans* y 1.06 mm para *S. pyogenes*. Estos halos son muy similares a los presentados por los Colutorios A y B.

El blanco positivo 2 (aceite esencial A5 al 100%) mostró un halo de inhibición promedio de 3.45 mm para *S. mutans* y 3 mm para *S. pyogenes*. Estos halos son superiores a los exhibidos por los Colutorios A y B.

**Tabla 18. Actividad antibacteriana de los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales**

Microorganismo	Diámetro de los halos de inhibición (mm)								
	Listerine	Encident	Oraldine	Colgate Plax	Colutorio A	Colutorio B	Blanco negativo	Blanco positivo (A4)	Blanco positivo (A5)
<i>S. mutans</i> repetición 1	0	4	0.3	0.2	1	1	0	1	4
<i>S. mutans</i> repetición 2	0	3.7	0.4	0.3	1	1	0	1	4.4
<i>S. mutans</i> repetición 3	0	4	0.3	0.2	1.2	1	0	1.2	4
<i>S. mutans</i> repetición 4	0	4	0.3	0.2	1	1	0	1	4.3
<i>S. mutans</i> repetición 5	0	3.6	0.2	0.1	1.1	1.3	0	1	4
<i>S. pyogenes</i> repetición 1	0	5	0.4	15	1	1	0	1	3
<i>S. pyogenes</i> repetición 2	0	5	0.4	13.6	1	1	0	1	3.2
<i>S. pyogenes</i> repetición 3	0	4.4	0.3	14.8	1	1.1	0	1	2.8
<i>S. pyogenes</i> repetición 4	0	5	0.3	15	1	1	0	1	3
<i>S. pyogenes</i> repetición 5	0	5	0.4	15	1	1	0	1.3	3

Fuente: La autora, con base en estudio de la actividad antibacteriana

### **7.6.1 Análisis Estadístico de la Actividad Antibacteriana de los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antibacteriana de los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales se realizó mediante el Software Statistix 8.0. Frecuentemente para este tipo de casos se realiza la prueba estadística paramétrica del Análisis de Varianza de una vía sin embargo, esta prueba es útil siempre y cuando los datos obtenidos sean normales. En esta investigación, los datos obtenidos no cumplen con esta premisa por tal razón, se procedió a realizar la prueba de Kruskal Wallis ya que reemplaza a la paramétrica Análisis de Varianza de una Vía.

#### **7.6.1.1 Prueba de Kruskal Wallis contrastando los diámetros del halo de inhibición generados por los enjuagues bucales para *Streptococcus mutans***

- Hipótesis Nula: Los seis enjuagues bucales utilizados en el estudio de la actividad antibacteriana tienen medianas del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares.
- Hipótesis Alternativa: El valor de la mediana del diámetro del halo de inhibición generado por al menos de uno de estos enjuagues bucales es diferente a los generados por los otros enjuagues.
- Nivel de significancia (alfa): 0.05

Los resultados emitidos por Statistix 8.0 fueron:

<b>Tabla 19. Análisis de Varianza No Paramétrico de una Vía de Kruskal-Wallis</b>		
<b>Enjuague bucal (Variable)</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Sample Size (Tamaño de la muestra)</b>
Colgate Plax	8.8	5
Colutorio A	20.8	5
Colutorio B	20.2	5
Encident	28.0	5
Listerine	3.0	5
Oraldine	12.2	5
<b>Total</b>	15.5	30

Fuente: La autora, con base en Statistix 8.0

Valor del Estadístico de Kruskal-Wallis (H): 27.61

Valor de la probabilidad asociada al estadístico (P): 0.00

**Conclusión:** Al menos uno de los enjuagues bucales está generando un halo de inhibición mucho más fuerte que los otros.

Para determinar cual de los enjuagues está generando tal halo de inhibición se realizó una prueba extra de comparaciones entre las medianas de todos los pares posibles de enjuagues (Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test, Statistic 8.0), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

<b>Tabla 20. Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test</b>	
<b>Enjuague bucal</b>	<b>Perteneciente o afín al grupo</b>
Encident	A
Colutorio A	AB
Colutorio B	AB
Oraldine	ABC
Colgate Plax	BC
Listerine	C

Fuente: La autora, con base en Statistix 8.0

Por tanto, hay tres grupos de enjuagues estadísticamente afines entre sí (por consiguiente también afines en su eficacia inhibitoria in vitro frente a *S. mutans*):

- Encident, el Colutorio A, el Colutorio B y Oraldine tienen eficacias muy similares entre sí.
- El Colutorio A, el Colutorio B, Oraldine y Colgate tienen eficacias muy similares entre sí.
- Oraldine, Colgate Plax y Listerine tienen eficacias muy similares entre sí.

En otras palabras, separándose, por tanto, nítidamente la eficacia de los siguientes enjuagues:

- Encident y Colgate Plax: el primero es absolutamente mejor que el segundo.
- Encident y Listerine: el primero es absolutamente mejor.
- El Colutorio A con Listerine: siendo el primero el mejor.
- El Colutorio B con Listerine: siendo el primero el mejor.

#### **7.6.1.2 Prueba de Kruskal Wallis contrastando los diámetros del halo de inhibición generados por los enjuagues bucales para *Streptococcus pyogenes***

- Hipótesis Nula: Los seis enjuagues bucales utilizados en el estudio de la actividad antibacteriana tienen medianas del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares.
- Hipótesis Alternativa: El valor de la mediana del diámetro del halo de inhibición generado por al menos de uno de estos enjuagues bucales es diferente a los generados por los otros enjuagues.
- Nivel de significancia (alfa): 0.05

Los resultados emitidos por Statistix 8.0 fueron:

<b>Tabla 21. Análisis de Varianza No Paramétrico de una Vía de Kruskal-Wallis</b>		
<b>Enjuague bucal (Variable)</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Sample Size (Tamaño de la muestra)</b>
Colgate Plax	28.0	5
Colutorio A	15.0	5
Colutorio B	16.0	5
Encident	23.0	5
Listerine	3.0	5
Oraldine	8.0	5
<b>Total</b>	15.5	30

Fuente: La autora, con base en Statistix 8.0

Valor del Estadístico de Kruskal-Wallis (H): 28.46

Valor de la probabilidad asociada al estadístico (P): 0.00

**Conclusión:** Al menos uno de los enjuagues bucales está generando un halo de inhibición mucho más fuerte que los otros.

Para determinar cual de los enjuagues está generando tal halo de inhibición se realizó una prueba extra de comparaciones entre las medianas de todos los pares posibles de enjuagues (Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test, Statistic 8.0), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

<b>Tabla 22. Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test</b>	
<b>Enjuague bucal</b>	<b>Perteneciente o afín al grupo</b>
Colgate Plax	A
Encident	AB
Colutorio B	ABC
Colutorio A	ABC
Oraldine	BC
Listerine	C

Fuente: La autora, con base en Statistix 8.0

Por tanto, hay tres grupos de enjuagues estadísticamente afines entre sí (por consiguiente también afines en su eficacia inhibitoria in vitro frente a *S. pyogenes*):

- Colgate Plax, Encident, el Colutorio A y el Colutorio B tienen eficacias muy similares entre sí.
- Encident, el Colutorio B, el Colutorio A y Oraldine tienen eficacias muy similares entre sí.
- El Colutorio B, el Colutorio A, Oraldine y Listerine tienen eficacias muy similares entre sí.

En otras palabras, separándose, por tanto, nítidamente la eficacia de los siguientes enjuagues:

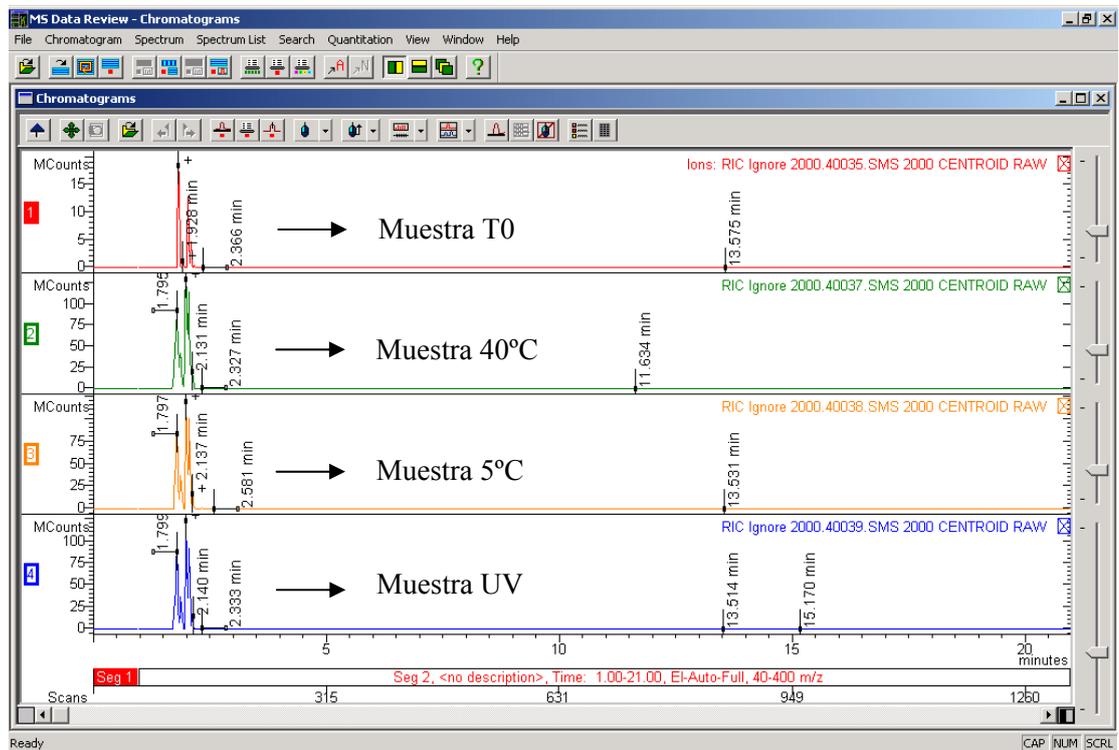
- Colgate Plax y Oraldine: el primero es absolutamente mejor que el segundo.
- Colgate Plax y Listerine: el primero es absolutamente mejor.
- Encident y Listerine: siendo el primero el mejor.

### **7.7 Estabilidad del colutorio elaborado**

En las Tablas 23-25 se presentan los datos correspondientes a la estabilidad acelerada del colutorio. Todos los parámetros a evaluar se midieron a los tiempos establecidos en el estudio excepto el contenido de aceite esencial de la hoja de ishpingo (A1).

La cuantificación del aceite esencial en la fórmula se realizó mediante GC-MS y se efectuó únicamente a tiempo cero y a los sesenta días de duración del estudio por la sugerencia y asesoría de un Docente Investigador experimentado en técnicas GC-MS. Esta cuantificación se realizó mediante la comparación de las áreas bajo el pico más alto presente en cada muestra, considerándose al área del colutorio a tiempo cero como la concentración al 100% del aceite esencial de la hoja de ishpingo. (Ver gráfico 6).

**Gráfico 6.** Cromatogramas de los Colutorios sometidos al estudio de estabilidad acelerada



Fuente: GC-MS

Como se puede observar en el Gráfico 6, los cromatogramas muestran que durante el tiempo de duración del estudio de estabilidad, los colutorios no han variado su composición química ya que, se observan los mismos picos, los cromatogramas son idénticos.

**Tabla 23. Resultados de la estabilidad en estufa a 40°C**

<b>Características</b>		<b>Tiempo cero</b>	<b>24 horas</b>	<b>7 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>60 días</b>
<b>Organolépticas</b>	<b>Aspecto</b>	Líquido transparente	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración
	<b>Color</b>	Verde limón	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración
	<b>Olor</b>	Ishpingo y menta	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración
	<b>Sabor</b>	Picante-ishpingo	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración
<b>Físico-químicas</b>	<b>pH</b>	8	8	8	8	8	8
	<b>Densidad (g/ml)</b>	1.0611	1.0644	1.0673	1.0657	1.0648	1.0685
	<b>Contenido de A1 (área bajo el pico más alto)</b>	3.923*10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	4.016*10 <sup>8</sup>
<b>Microbiológicas</b>	<b>Aerobios totales</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>Coliformes totales</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>Mohos y levaduras</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Envase</b>	<b>Deformación</b>	Ninguna	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración

Fuente: La autora, con base en estudio de estabilidad acelerada

**Tabla 24. Resultados de la estabilidad en nevera a 5°C**

<b>Características</b>		<b>Tiempo</b>	<b>24 horas</b>	<b>7 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>60 días</b>
------------------------	--	---------------	-----------------	---------------	----------------	----------------	----------------

		<b>cero</b>					
<b>Organolépticas</b>	<b>Aspecto</b>	Líquido transparente	Sin alteración				
	<b>Color</b>	Verde limón	Sin alteración				
	<b>Olor</b>	Ishpingo y menta	Sin alteración				
	<b>Sabor</b>	Picante-ishpingo	Sin alteración				
<b>Físico-químicas</b>	<b>pH</b>	8	8	8	8	8	8
	<b>Densidad (g/ml)</b>	1.0611	1.0594	1.0646	1.0721	1.0625	1.0654
	<b>Contenido de A1 (área bajo el pico más alto)</b>	3.923*10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	3.560*10 <sup>8</sup>
<b>Microbiológicas</b>	<b>Aerobios totales</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>Coliformes totales</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>Mohos y levaduras</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Envase</b>	<b>Deformación</b>	Ninguna	Sin alteración				

Fuente: La autora, con base en estudio de estabilidad acelerada

<b>Tabla 25. Resultados de la estabilidad en radiación luminosa (UV)</b>							
<b>Características</b>		<b>Tiempo cero</b>	<b>24 horas</b>	<b>7 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>60 días</b>
<b>Organolépticas</b>	<b>Aspecto</b>	Líquido	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración

		transparente					
	<b>Color</b>	Verde limón	Sin alteración	Modificado, más claro	Modificado, más claro	Modificado, más claro	Modificado, más claro
	<b>Olor</b>	Ishpingo y menta	Sin alteración	Modificado, a plástico	Modificado, a plástico	Modificado, a plástico	Modificado, a plástico
	<b>Sabor</b>	Picante-ishpingo	Sin alteración	Modificado, a plástico	Modificado, a plástico	Modificado, a plástico	Modificado, a plástico
<b>Físico-químicas</b>	<b>pH</b>	8	8	8	8	8	8
	<b>Densidad (g/ml)</b>	1.0611	1.0661	1.0653	1.0724	1.0636	1.0657
	<b>Contenido de A1 (área bajo el pico más alto)</b>	$3.923 \cdot 10^8$	-	-	-	-	$3.471 \cdot 10^8$
<b>Microbiológicas</b>	<b>Aerobios totales</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>Coliformes totales</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>Mohos y levaduras</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Envase</b>	<b>Deformación</b>	Ninguna	Sin alteración	Sin alteración	Cambio de color (amarillo)	Más amarillo, cuarteado	Más amarillo, cuarteado

Fuente: La autora, con base en estudio de estabilidad acelerada

El Colutorio sometido al estudio de estabilidad en estufa a 40°C, no presenta cambios en cuanto a sus propiedades organolépticas durante los 60 días de duración del estudio. El pH se mantiene estable con un valor de 8. A pesar de que la densidad presenta ligeros cambios durante todo el estudio, los valores se mantienen dentro del rango considerado aceptable, es decir, entre 1.0824 y 1.0399 g/ml ( $\pm 2\%$  de variación del valor inicial), presentando un valor promedio de 1.0661 g/ml. El Colutorio no presenta ningún tipo de contaminación microbiana y el envase no sufre alteraciones de ninguna clase. El contenido de principio activo aumentó en un 2.37%, sin embargo, el valor se encuentra dentro del  $\pm 10\%$  de variación considerado aceptable.

El estudio de estabilidad en nevera a 5°C demuestra que el colutorio no presenta cambios de sus propiedades organolépticas hasta el final del estudio. El pH tampoco presenta variación, se mantiene en 8. La densidad se mantiene dentro del rango aceptable y presenta un promedio de 1.0648 g/ml. El envase no presenta cambios y no se observa contaminación microbiana de ningún tipo. El principio activo disminuyó en un 9.26%, encontrándose dentro del rango aceptable de variación.

El estudio de estabilidad en radiación luminosa (UV) indica que el colutorio, a partir de los 7 días de iniciado el estudio, presenta cambios en la integridad del envase utilizado lo que a su vez, afectó en el color, olor y sabor del colutorio. El pH se mantiene estable en un valor de 8. La densidad se mantiene dentro del rango aceptable con un promedio de 1.0606 g/ml durante todo el estudio. No se evidencia proliferación microbiana. El principio activo disminuyó en un 11.53%, este valor se encuentra fuera del rango considerado aceptable.

## 7.8 Análisis del Perfil Organoléptico del Colutorio elaborado frente al Perfil de Colgate Plax

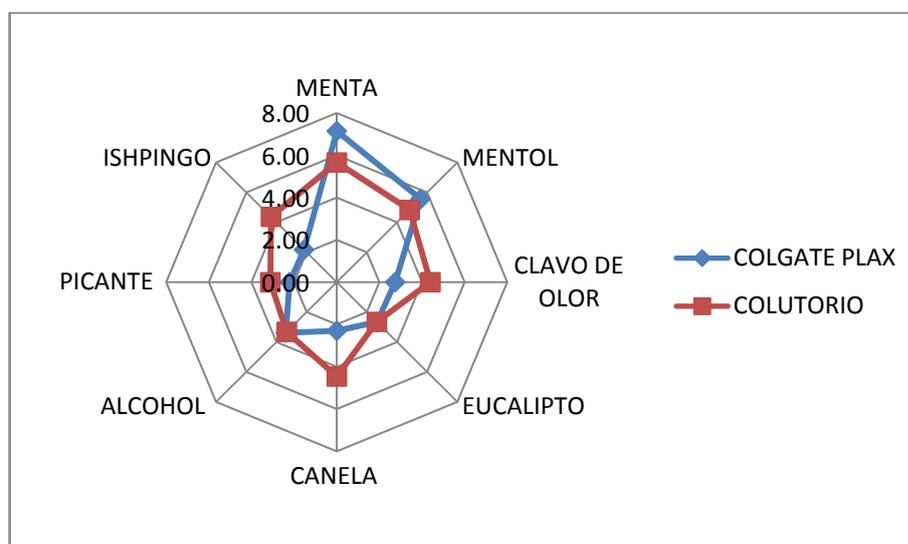
Con los datos obtenidos en las dos sesiones evaluativas con los jueces (24 datos por atributo), se procedió a sacar el promedio de los mismos de manera que se obtuvieron los siguientes resultados:

- En cuanto al aroma, los jueces indican que Colgate Plax exhibe el aroma menta y mentol con mayor intensidad que el Colutorio elaborado, éste por su parte, presenta el aroma del clavo de olor, de la canela, del ishpingo y picante más fuerte que Colgate Plax. Ambos enjuagues presentan el aroma de eucalipto y alcohol en intensidades muy parecidas. (Ver Tabla 26 y Gráfico 6)

	Menta	Mentol	Clavo de olor	Eucalipto	Canela	Alcohol	Picante	Ishpingo
Colgate Plax	7.14	5.56	2.74	2.67	2.30	3.39	2.21	2.17
Colutorio	5.66	4.83	4.39	2.65	4.46	3.32	3.12	4.37

Fuente: La autora, con base en prueba del perfil del sabor

**Gráfico 6. Perfil del Aroma de Enjuagues Bucales**



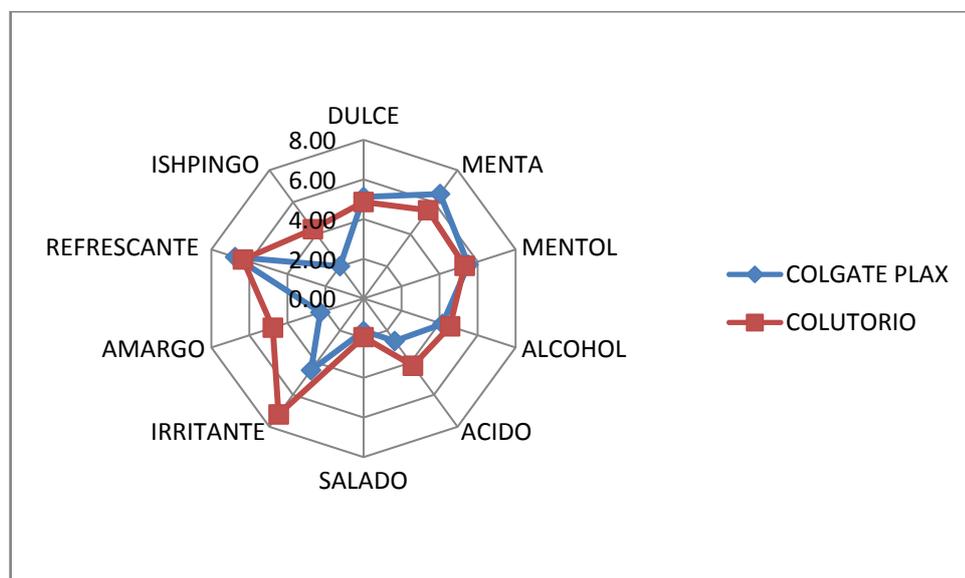
Fuente: La autora, con base en prueba del perfil del sabor

- En lo referente al sabor, el panel sensorial definió que el Colutorio elaborado presenta un sabor de ishpingo, amargo, irritante y ácido mucho mayor que Colgate Plax. Por su parte, Colgate Plax demuestra únicamente un sabor de menta superior al Colutorio elaborado. Ambos enjuagues al parecer, tienen un sabor de alcohol, de mentol, salado y refrescante muy similares. (Ver Tabla 27 y Gráfico 7)

<b>Tabla 27. Intensidad de sabores de enjuagues bucales</b>										
	Dulce	Menta	Mentol	Alcohol	Acido	Salado	Irritante	Amargo	Refrescante	Ishpingo
Colgate Plax	5.12	6.51	5.51	4.15	2.65	1.64	4.48	2.27	6.76	2.01
Colutorio	4.86	5.50	5.32	4.55	4.20	1.95	7.23	4.77	6.35	4.31

Fuente: La autora, con base en prueba del perfil del sabor

**Gráfico 7. Perfil del Sabor de Enjuagues Bucales**



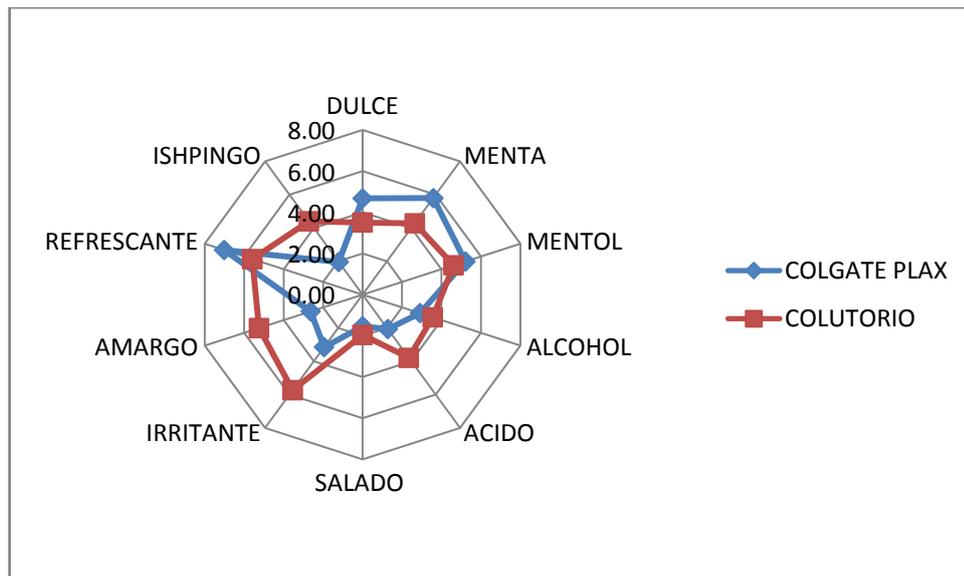
Fuente: La autora, con base en prueba del perfil del sabor

- El panel sensorial estableció que, en lo que tiene que ver con el sabor residual, Colgate Plax presenta un sabor residual dulce, de mentol y refrescante mayor que el Colutorio elaborado mientras que, éste, exhibe un sabor residual de ishpingo, amargo, irritante y ácido mayor que Colgate Plax. Ambos enjuagues bucales son parecidos en la intensidad de los sabores residuales alcohol y salado. (Ver Tabla 28 y Gráfico 8)

<b>Tabla 28. Intensidad de sabores residuales de enjuagues bucales</b>										
	Dulce	Menta	Mentol	Alcohol	Ácido	Salado	Irritante	Amargo	Refrescante	Ishpingo
Colgate Plax	4.68	5.80	5.21	2.91	2.07	1.53	3.15	2.63	7.02	1.96
Colutorio	3.50	4.28	4.62	3.56	3.79	1.96	5.73	5.25	5.59	4.40

Fuente: La autora, con base en prueba del perfil del sabor

**Gráfico 8. Perfil del Sabor residual de Enjuagues Bucles**



Fuente: La autora, con base en prueba del perfil del sabor

## 8. CONCLUSIONES

- Se confirma la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la hoja de ishpingo, coincidiendo con la investigación realizada por Noriega y Dacarro (2008).
- Los aceites esenciales provenientes de Transcutukú (A2 y A3) presentan un perfil cromatográfico diferente al del aceite esencial de la hoja de ishpingo; el componente que se encuentra en mayor proporción es el eucaliptol.
- El aceite esencial de la hoja de ishpingo utilizado para la elaboración del colutorio (A4) presenta una CMB para *S. mutans* de 0.26% y una CMB para *S. pyogenes* menor a 0.097%.
- El aceite esencial de clavo de olor utilizado para la elaboración del colutorio (A5) presenta una CMB para *S. mutans* de 0.26% y una CMB para *S. pyogenes* de 1.56%.
- El aceite esencial A1 presenta una CMB superior a la del aceite esencial A4 por tal motivo es descartado como principio activo en la elaboración del colutorio.
- El colutorio elaborado presenta características organolépticas y físico-químicas similares a las de los enjuagues bucales comerciales.
- Tanto *Streptococcus mutans* como *Streptococcus pyogenes* mostraron susceptibilidad frente al colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo y clavo de olor.
- El colutorio elaborado es más eficaz que Listerine y Oraldine en el control del crecimiento de *S. mutans* y *S. pyogenes*.
- El enjuague bucal Encident es más eficiente que el colutorio elaborado en el control del crecimiento de *S. mutans* y *S. pyogenes*.
- El enjuague bucal Colgate Plax es más eficiente que el colutorio elaborado en el control del crecimiento de *S. pyogenes* pero es menos eficiente en el control de *S. mutans*.
- El polietileno no es un material de acondicionamiento adecuado para el colutorio puesto que, a pesar de mantenerse en buen estado a 40°C y 5°C, sufre severas modificaciones frente a la radiación UV lo que modifica las propiedades organolépticas del colutorio elaborado.

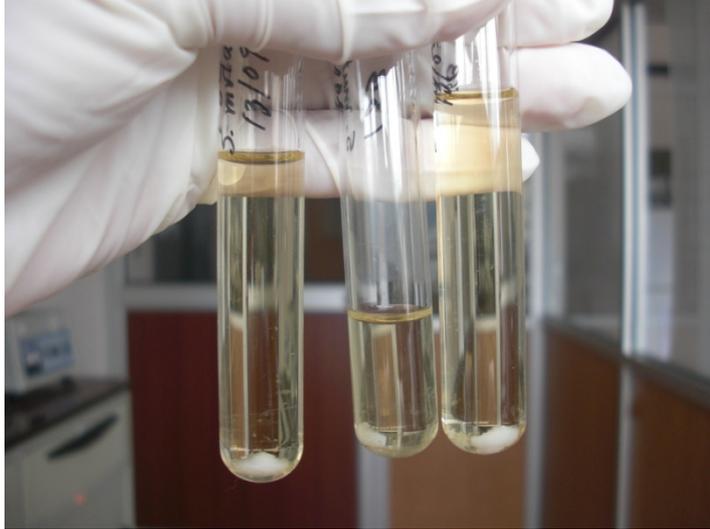
- El estudio de estabilidad acelerada demuestra que el contenido del principio activo principal (aceite esencial de la hoja de ishpingo) en la fórmula varía en el tiempo. A 40°C y 5°C se mantiene dentro del rango considerado aceptable ( $\pm 10\%$ ), mientras que en radiación luminosa (UV) se encuentra fuera de este rango.
- El aumento en el contenido de aceite esencial de la hoja de ishpingo en el colutorio durante el estudio de estabilidad a 40°C, puede deberse a que el colutorio sufrió una evaporación del agua. Esto a su vez provoca la disminución del volumen y el aumento de la concentración de aceite esencial.
- Los ligeros cambios de la densidad del colutorio que se presentan durante el estudio de estabilidad acelerada, pueden deberse a la imprecisión del método por: errores del operador, del instrumento de medición, de la balanza y otros.
- El colutorio elaborado presenta un perfil de aroma muy parecido al de Colgate Plax.
- En el perfil del sabor se evidencia la diferencia del sabor de ishpingo que presenta el colutorio elaborado frente a Colgate Plax.
- El colutorio elaborado presenta un perfil de sabor residual un poco diferente a Colgate Plax ya que es más irritante y menos refrescante.
- En general, los resultados del perfil organoléptico demuestra que el colutorio elaborado no es un producto igual a Colgate Plax pero, evaluando cuantitativamente sus características sensoriales, las diferencias no son significativas.

## **9. RECOMENDACIONES**

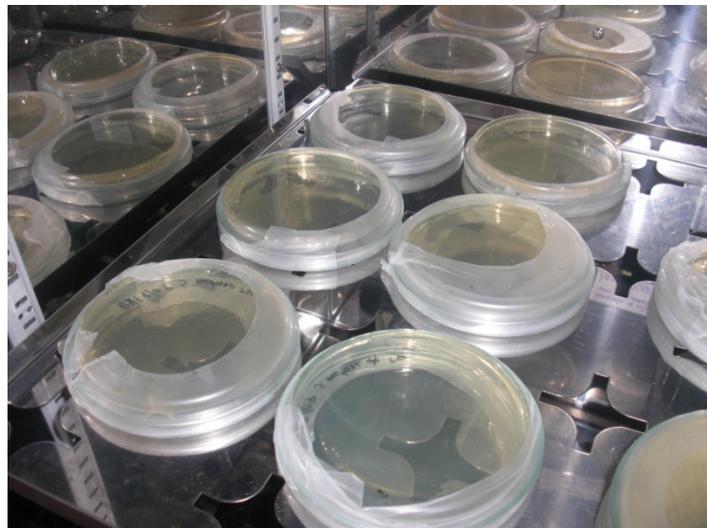
- Investigar la especie de la cual Chankuap está extrayendo los aceites esenciales provenientes de Trasnscutukú (A2 y A3), puesto que su composición química es totalmente diferente a la de los aceites provenientes del Valle del Upano (A1 y A4).
- Realizar un estudio de estabilidad acelerada y a largo plazo utilizando otro material de acondicionamiento distinto al polietileno.

- Realizar un estudio in-vitro de la eficacia del colutorio frente a otros microorganismos presentes en la placa bacteriana.
- Realizar un estudio in-vivo de la eficacia del colutorio para comprobar si el comportamiento es el mismo que in-vitro.
- A la hora de fabricar un producto a gran escala a base de aceites esenciales, es importante tomar en cuenta la variabilidad que se puede tener en cuanto a la Concentración Mínima Bactericida de cada lote.

## 10. FOTOGRAFÍAS



Fotografía 1. Pellet luego de centrifugar  
Fuente: La autora



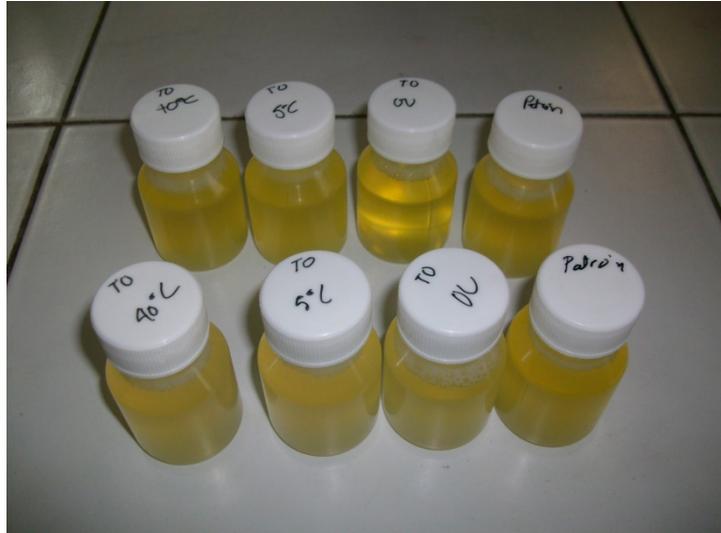
Fotografía 2. Cajas petri incubándose para determinar la CMB de los aceites  
esenciales  
Fuente: La autora



Fotografía 3. Enjuagues bucales comerciales usados como muestras  
Fuente: La autora



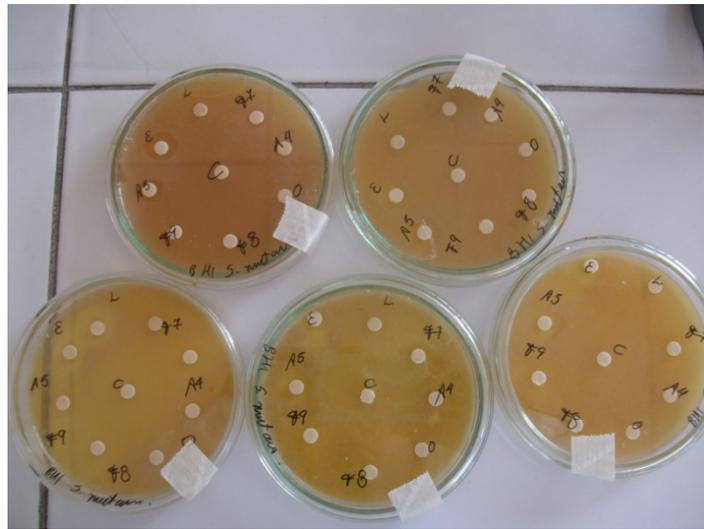
Fotografía 4. Evaluadores mientras califican los enjuagues bucales  
Fuente: La autora



Fotografía 5. Colutorio elaborado envasado en el material de acondicionamiento  
Fuente: La Autora

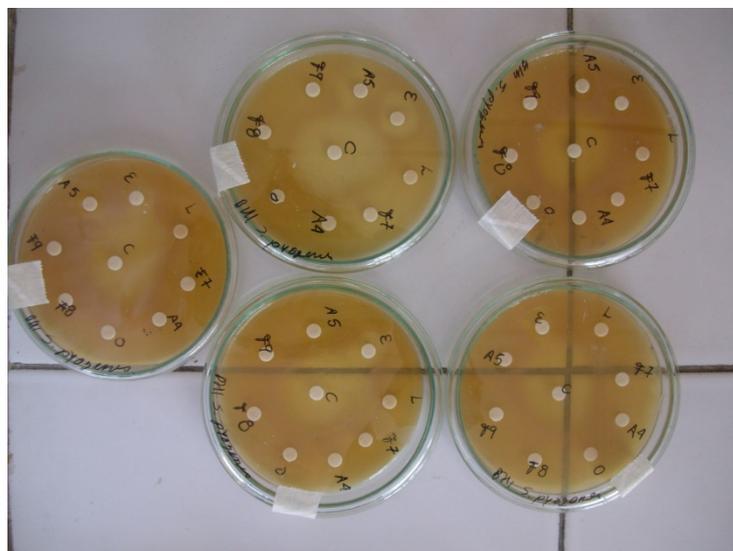


Fotografía 6. Panel sensorial en entrenamiento  
Fuente: La Autora



Fotografía 7. Halos de inhibición (mm) que mostraron los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales en el estudio de actividad antibacteriana frente a *S. mutans* por el método de difusión en medio sólido

Fuente: La autora



Fotografía 8. Halos de inhibición (mm) que mostraron los colutorios elaborados y los enjuagues bucales comerciales en el estudio de actividad antibacteriana frente a *S. mutans* por el método de difusión en medio sólido

Fuente: La autora

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Tinción Gram

Según Gamazo y otros, la técnica se realiza de la siguiente manera:

1. Preparar un frotis bacteriano recordando que en las extensiones demasiado densas de células, los colorantes no llegan a teñir la muestra homogéneamente.
2. Teñir con cristal violeta (1 minuto).
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante. En este paso y en el resto de pasos de lavado o coloración es esencial no arrastrar parte de la preparación en el proceso. Para evitar que ocurra esto, incline el portaobjetos y aplique el agua o disolvente en su parte superior de manera que el líquido resbale lentamente sobre el frotis.
4. Cubrir con lugol (1 minuto).
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Lavar la preparación con etanol-acetona hasta que observe que no puede arrastrar más colorante de la muestra (10-20 segundos).
7. Lavar con agua para eliminar los restos de disolvente.
8. Teñir con safranina (1 minuto).
9. Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste (safranina).
10. Secar la preparación entre dos papeles de filtro con cuidado de no frotar, o bien, secar al calor de la llama.
11. Examinar al microscopio con el objetivo de inmersión. Las bacterias Grampositivas quedan teñidas de violeta, mientras que las gramnegativas aparecen de color rojo.

## **Anexo 2. Prueba de la catalasa**

Cuando se ponen en contacto una bacteria con actividad catalasa con peróxido de hidrógeno al 3% se producen burbujas de oxígeno. Esta prueba se puede emplear para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positiva) del género *Streptococcus* (catalasa negativa).

### **Anexo 3. Instrucciones de procedimiento para la evaluación sensorial**

#### **INSTRUCCIONES**

Durante esta evaluación, usted va a probar cuatro diferentes enjuagues bucales siguiendo las siguientes instrucciones:

1. Coloque en su boca todo el contenido de enjuague que se encuentra en el vaso.
2. Realice buchadas (retener y mover el enjuague en la boca) durante diez segundos.
3. Al término de los diez segundos, deseche el enjuague en el vaso de su izquierda.
4. Evalúe el enjuague en la hoja adjunta en la siguientes etapas:
  - **PRIMER IMPACTO:** primer contacto del enjuague en la boca.
  - **DURANTE:** mientras realiza las buchadas.
  - **FINAL DE LA EVALUACIÓN:** después de desechar el enjuague.
5. Tome un sorbo de agua (vaso de la derecha).
6. Deguste una galleta soda.
7. Repita el procedimiento para las siguientes muestras.

Evalúe cada uno de los productos usando la siguiente ESCALA DE 7 PUNTOS.

1= me disgusta mucho
2= me disgusta moderadamente
3= me disgusta ligeramente
4= ni me gusta ni me disgusta
5= me gusta ligeramente
6= me gusta moderadamente
7= me gusta mucho

### Anexo 4. Evaluación Sensorial Enjuagues Bucales

EDAD  AÑOS

SEXO  MASCULINO  
 FEMENINO

**PRUEBE LAS MUESTRAS DE IZQUIERDA A DERECHA**

<p>DESPEGUE LA ETIQUETA ADHESIVA Y PEGUE EN EL SIGUIENTE CUADRO</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 80px; margin: 10px auto;"></div> <p>SIGA LAS INSTRUCCIONES Y CALIFIQUE</p> <p><b>PRIMER INSTANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>DURANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>FINAL DE LA EVALUACION</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p>DE MANERA GENERAL CALIFIQUE EN PRODUCTO CON LA MISMA ESCALA INDICADA</p> <p>ESCRIBA CUALQUIER COMENTARIO ADICIONAL <input style="width: 100px;" type="text"/></p>	<p>DESPEGUE LA ETIQUETA ADHESIVA Y PEGUE EN EL SIGUIENTE CUADRO</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 80px; margin: 10px auto;"></div> <p>SIGA LAS INSTRUCCIONES Y CALIFIQUE</p> <p><b>PRIMER INSTANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>DURANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>FINAL DE LA EVALUACION</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p>DE MANERA GENERAL CALIFIQUE EN PRODUCTO CON LA MISMA ESCALA INDICADA</p> <p>ESCRIBA CUALQUIER COMENTARIO ADICIONAL <input style="width: 100px;" type="text"/></p>	<p>DESPEGUE LA ETIQUETA ADHESIVA Y PEGUE EN EL SIGUIENTE CUADRO</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 80px; margin: 10px auto;"></div> <p>SIGA LAS INSTRUCCIONES Y CALIFIQUE</p> <p><b>PRIMER INSTANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>DURANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>FINAL DE LA EVALUACION</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p>DE MANERA GENERAL CALIFIQUE EN PRODUCTO CON LA MISMA ESCALA INDICADA</p> <p>ESCRIBA CUALQUIER COMENTARIO ADICIONAL <input style="width: 100px;" type="text"/></p>	<p>DESPEGUE LA ETIQUETA ADHESIVA Y PEGUE EN EL SIGUIENTE CUADRO</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 80px; margin: 10px auto;"></div> <p>SIGA LAS INSTRUCCIONES Y CALIFIQUE</p> <p><b>PRIMER INSTANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>DURANTE</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p><b>FINAL DE LA EVALUACION</b></p> <p>SABOR <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE IRRITACIÓN <input type="text"/></p> <p>SENSACIÓN DE FRESCURA <input type="text"/></p> <p>DE MANERA GENERAL CALIFIQUE EN PRODUCTO CON LA MISMA ESCALA INDICADA</p> <p>ESCRIBA CUALQUIER COMENTARIO ADICIONAL <input style="width: 100px;" type="text"/></p>
---	---	---	---



10	D	347
	A	951
	B	595
	C	465
11	C	202
	D	725
	A	380
	B	665
12	B	899
	C	619
	D	409
	A	772
13	A	620
	B	664
	C	174
	D	876
14	D	911
	A	929
	B	821
	C	615
15	C	486
	D	947
	A	263
	B	213
16	B	703
	C	888
	D	381
	A	929
17	A	335
	B	325
	C	530
	D	789
18	D	146
	A	155
	B	560
	C	174
19	C	963
	D	512
	A	596
	B	808
20	B	826
	C	749
	D	181
	A	721
21	A	609
	B	364
	C	361
	D	672

22	D	266
	A	236
	B	226
	C	288
23	C	520
	D	283
	A	196
	B	641
24	B	837
	C	350
	D	226
	A	288
25	A	506
	B	984
	C	315
	D	719
26	D	643
	A	101
	B	195
	C	934
27	C	867
	D	188
	A	310
	B	398
28	B	272
	C	202
	D	942
	A	768
29	A	928
	B	787
	C	458
	D	902
30	D	308
	A	645
	B	672
	C	621
31	C	207
	D	182
	A	506
	B	402
32	B	962
	C	218
	D	125
	A	597
33	A	907
	B	499
	C	986
	D	187

34	D	407
	A	489
	B	801
	C	278
35	C	906
	D	617
	A	125
	B	872
36	B	437
	C	387
	D	210
	A	648
37	A	257
	B	810
	C	568
	D	512
38	D	544
	A	685
	B	210
	C	119
39	C	518
	D	549
	A	961
	B	599
40	B	475
	C	367
	D	321
	A	616
41	A	565
	B	638
	C	216
	D	395
42	D	115
	A	732
	B	428
	C	458
43	C	973
	D	176
	A	338
	B	757
44	B	845
	C	834
	D	603
	A	137
45	A	244
	B	337
	C	562
	D	500

46	D	846
	A	125
	B	194
	C	111
47	C	235
	D	384
	A	610
	B	850
48	B	860
	C	445
	D	658
	A	123
49	A	493
	B	426
	C	249
	D	738
50	D	786
	A	968
	B	906
	C	213
51	C	672
	D	911
	A	700
	B	697
52	B	711
	C	591
	D	826
	A	416
53	A	429
	B	200
	C	475
	D	496
54	D	115
	A	583
	B	851
	C	612
55	C	931
	D	181
	A	688
	B	292
56	B	147
	C	725
	D	536
	A	193
57	A	573
	B	196
	C	872
	D	844

58	D	774
	A	781
	B	124
	C	771
59	C	671
	D	361
	A	184
	B	319
60	B	662
	C	544
	D	793
	A	605
61	A	918
	B	415
	C	160
	D	766
62	D	785
	A	322
	B	372
	C	640
63	C	264
	D	716
	A	741
	B	521
64	B	509
	C	202
	D	135
	A	860
65	A	681
	B	225
	C	201
	D	462
66	D	714
	A	456
	B	387
	C	125
67	C	841
	D	206
	A	865
	B	299
68	B	337
	C	605
	D	280
	A	577
69	A	134
	B	418
	C	924
	D	886

70	D	867
	A	976
	B	430
	C	314
71	C	607
	D	836
	A	271
	B	516
72	B	250
	C	353
	D	698
	A	951
73	A	757
	B	613
	C	169
	D	557
74	D	544
	A	583
	B	925
	C	639
75	C	139
	D	593
	A	149
	B	455
76	B	995
	C	434
	D	320
	A	101
77	A	709
	B	621
	C	134
	D	618
78	D	504
	A	236
	B	768
	C	364
79	C	942
	D	712
	A	214
	B	311
80	B	426
	C	449
	D	260
	A	613

### Anexo 6. Jueces entrenados para la Prueba del Perfil del Sabor

<b>Nº</b>	<b>Nombre</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Estado civil</b>
1	Sandra Elizabeth Ayala Valarezo	Mujer	20	Soltera
2	Cinthia Karina España Imbaquinga	Mujer	19	Soltera
3	Jaqueline Isabel Fuertes Rentería	Mujer	19	Soltera
4	Tatiana Alexandra Vásquez Villarreal	Mujer	22	Soltera
5	Angélica Maribel Cárdenas Rubio	Mujer	25	Soltera
6	Sofía Alexandra Peñaherrera Toledo	Mujer	21	Soltera
7	Lizeth Geovanna Chela Chugchilán	Mujer	21	Soltera
8	William Vinicio Haro Tipantiza	Hombre	23	Soltero
9	Diego Javier Caicedo De la Cruz	Hombre	21	Soltero
10	Pablo Alexis Reyes Donoso	Hombre	21	Soltero
11	Gabriel Alexander Arcos Pérez	Hombre	20	Soltero
12	Christian Andrés Torres Padilla	Hombre	21	Soltero

Fuente: La autora, con base en fichas de datos de jueces

**Anexo 7. Orden de presentación de muestras para el Perfilamiento del Colutorio**

A = Colgate Plax

B = Colutorio

<b>Panelista</b>	<b>Sesión</b>	<b>Orden de presentación</b>	<b>Código de muestra</b>
Gabriel Arcos	1	B	605
		A	543
Tatiana Vásquez	1	A	604
		B	271
Pablo Reyes	1	B	855
		A	382
Christian Torres	1	B	278
		A	916
Diego Caicedo	1	A	355
		B	617
Sofía Peñaherrera	1	A	399
		B	493
Jaqueline Fuertes	1	A	591
		B	132
Karina España	1	B	654
		A	547
Angélica Cárdenas	1	A	206
		B	538
Lizeth Chela	1	B	825
		A	732
Sandra Ayala	1	A	133
		B	324
William Haro	1	A	211
		B	311
Gabriel Arcos	2	A	207
		B	628
Tatiana Vásquez	2	B	625
		A	916
Pablo Reyes	2	A	476
		B	563
Christian Torres	2	A	417
		B	232
Diego Caicedo	2	B	735
		A	149
Sofía Peñaherrera	2	B	800
		A	999
Jaqueline Fuertes	2	B	623
		A	322

Karina España	2	A	514
		B	571
Angélica Cárdenas	2	B	415
		A	431
Lizeth Chela	2	A	211
		B	345
Sandra Ayala	2	B	781
		A	435
William Haro	2	B	231
		A	978

Fuente: La autora

## Anexo 8. Estudio de Perfilamiento de Enjuagues Bucales

Nombre: \_\_\_\_\_ Muestra: \_\_\_\_\_

Calificar cada atributo usando una escala de 1 al 10, por favor utilizar decimales.

**AROMA:** Coloque el vaso cerca de la nariz y aromatice tomando respiraciones cortas con la boca cerrada.

1. Menta: \_\_\_\_\_
2. Mentol: \_\_\_\_\_
3. Clavo de olor: \_\_\_\_\_
4. Eucalipto: \_\_\_\_\_
5. Canela: \_\_\_\_\_
6. Alcohol: \_\_\_\_\_
7. Picante: \_\_\_\_\_
8. Ishpingo: \_\_\_\_\_

**SABOR:** Tomar un pequeño sorbo del producto y mantenerlo en la boca por un espacio de 10 segundos, calificar los siguientes sabores además, calificar la espuma que genera en la boca. (1 cuando se hace buchadas con agua 1 10 al colocar una cuchara sopera de espumilla en la boca)

9. Espuma: \_\_\_\_\_

Sabores:

10. Dulce: \_\_\_\_\_
11. Menta: \_\_\_\_\_
12. Mentol: \_\_\_\_\_
13. Alcohol: \_\_\_\_\_
14. Ácido: \_\_\_\_\_
15. Salado: \_\_\_\_\_
16. Irritante o ardor: \_\_\_\_\_
17. Amargo: \_\_\_\_\_
18. Refreshante o cooling: \_\_\_\_\_
19. Ishpingo: \_\_\_\_\_

**SABOR RESIDUAL:** Sabores y aromas que persisten después de probar la muestra.

20. Dulce: \_\_\_\_\_
21. Menta: \_\_\_\_\_
22. Mentol: \_\_\_\_\_
23. Alcohol: \_\_\_\_\_
24. Ácido: \_\_\_\_\_
25. Salado: \_\_\_\_\_
26. Irritante o ardor: \_\_\_\_\_
27. Amargo: \_\_\_\_\_
28. Refreshante o cooling: \_\_\_\_\_
29. Ishpingo: \_\_\_\_\_

## Anexo 9. Ficha técnica Aceite Esencial de Ishpingo

Ficha técnica  
**Aceite Esencial de Canela**  
**(ishpink)**  
*Ocotea quixos*  
*Planta de canela nativa de Ecuador*



### **PRODUCTO:**

El aceite esencial de canela (ishpink), es un producto obtenido de las hojas de la planta *Ocotea quixos* por medio de una destilación por arrastre de vapor. Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

### **PRODUCIDO POR:**

Fundación Chankuap - Departamento de destilación de aceites esenciales

### **VIDA ÚTIL:**

24 meses a partir de la fecha de producción. Almacenarlo en un sitio fresco y seco en un frasco de color oscuro.

Al final del periodo de caducidad es aconsejable reanalizar el lote, si eso cumple con los parámetros de calidad se puede seguir utilizando el producto.

### **DESCRIPCION DE LA PLANTA:**

El ishpink es una planta arbórea perenne dicotiledónea que pertenece a la familia de las *Lauraceae*, genero *Ocotea*, especie *quixos*.

### **PARTE USADA DE LA PLANTA:**

Hojas.

### **PROCESO DE PRODUCCIÓN:**

El producto es extraído por destilación con agua y vapor de agua. El equipo es de acero inoxidable. Después de la destilación el aceite esencial es separado del agua fácilmente, como el aceite esencial flota sobre el agua debida a su densidad menor. Para eliminar el resto del agua se trata el aceite esencial con sulfato de sodio anhidro hasta que toda el agua es absorbida. No se añade ningún aditivo químico.

### **ESTÁNDARES DE EMPAQUE:**

Frasco de vidrio de color oscuro de 10 ml.

Peso del Aceite Esencial (10 ml) = 9.6 g +/- 0.3 g

Tamaño del frasco de 10ml = 59 x 24 mm

Peso del frasco = 26.2 g

### **Peso total bruto por frasco**

35.8 g +/- 0.3 g

### **Características organolépticas**

*Apariencia:* Líquido aceitoso transparente de color amarillo claro

*Olor:* nota típica de canela

**Estándares físico- químicos**

Densidad: 0,9609 g/ml

Índice de Refracción: 1,5265

Índice de acidez: 0,57

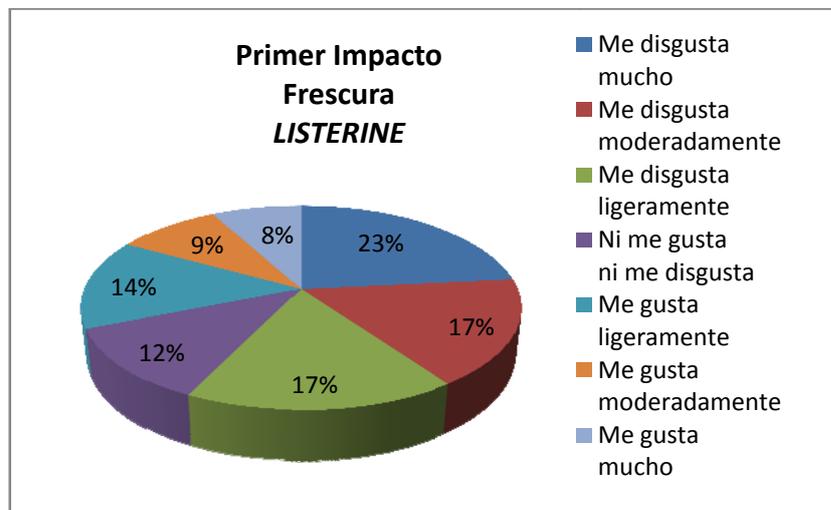
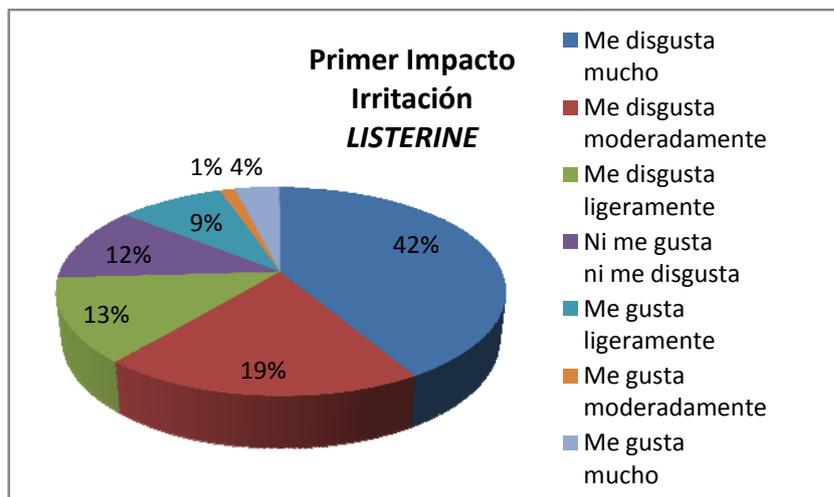
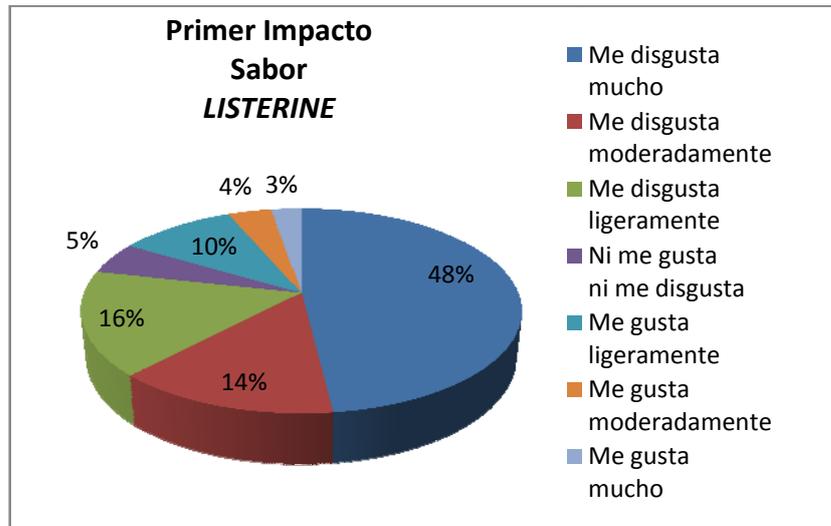
Solubilidad en alcohol: totalmente soluble en alcohol al 96°

Residuo sólido: 64,06%

**Actividad biológica:**

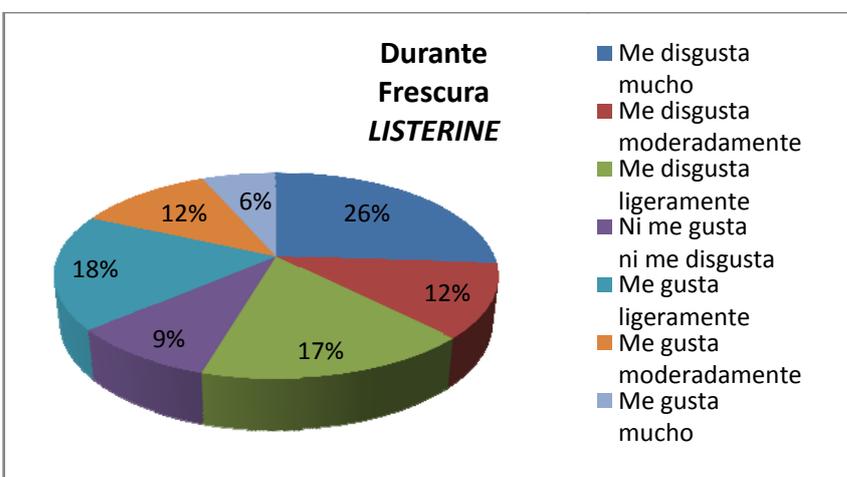
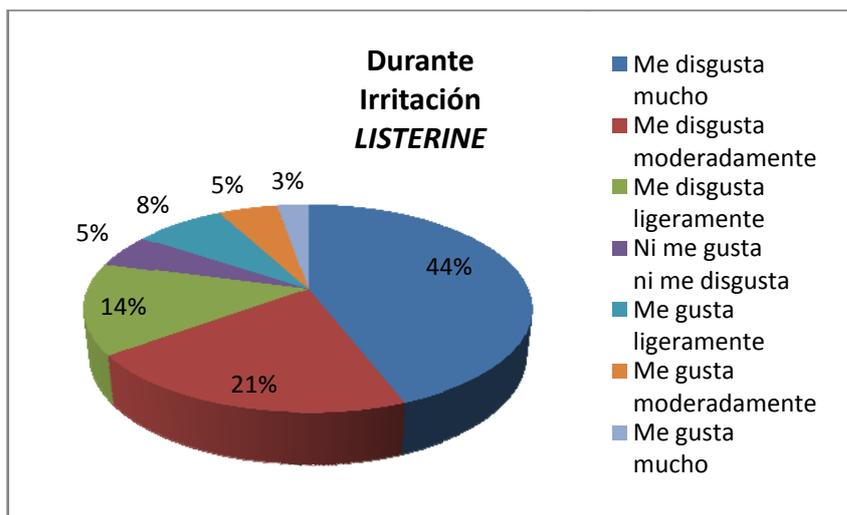
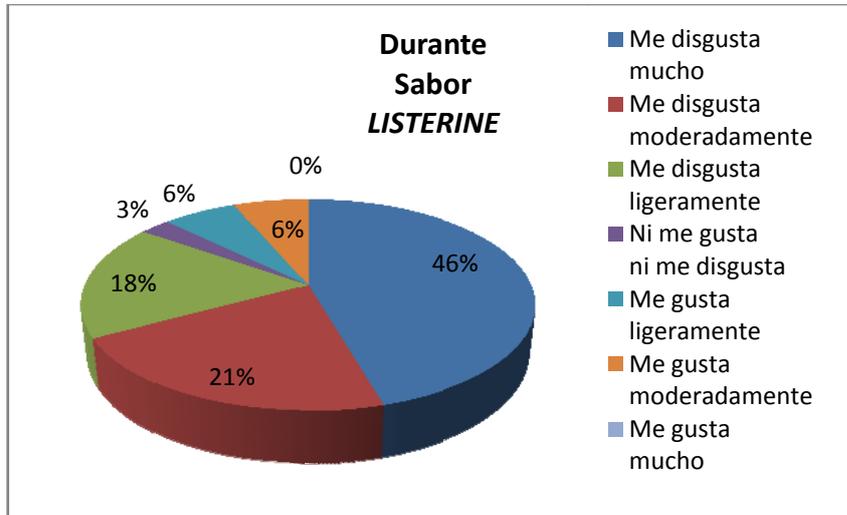
El aceite esencial de ishpink tiene una marcada actividad antifúngica sobretodo en respecto al hongo patógeno humano *Candida albicans*.

**Anexo 10. Calificaciones de Listerine al Primer Impacto<sup>134</sup>**



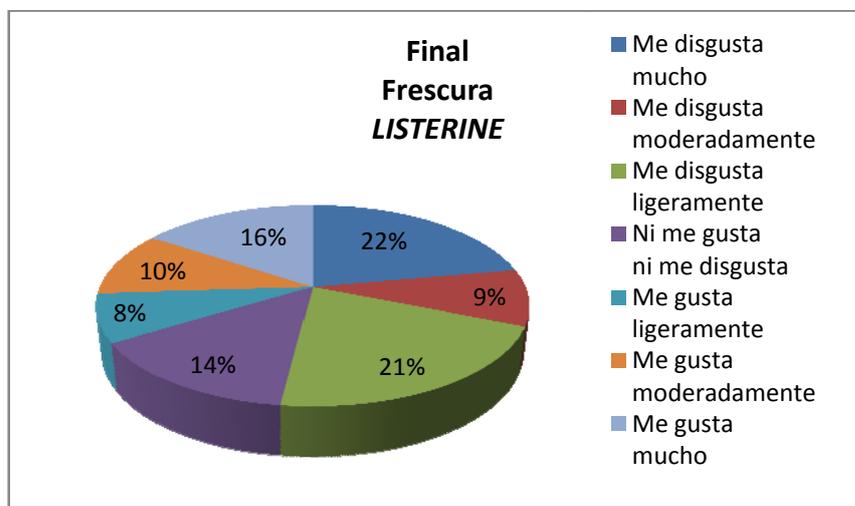
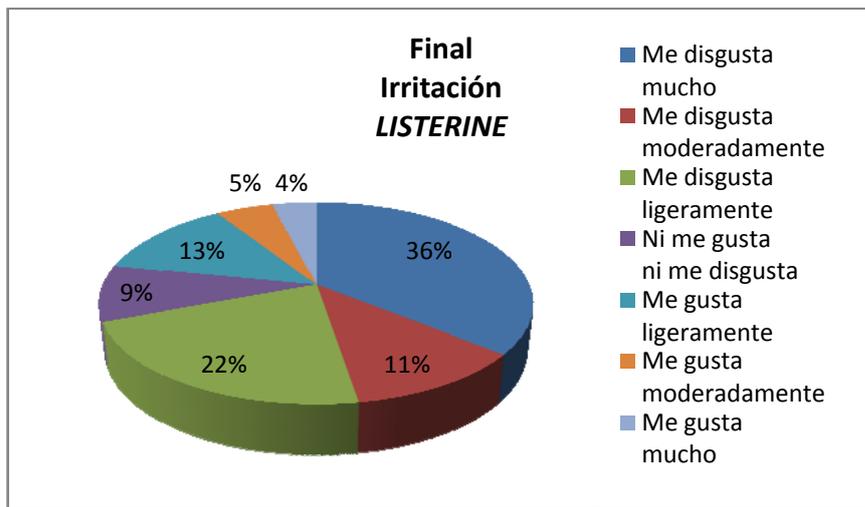
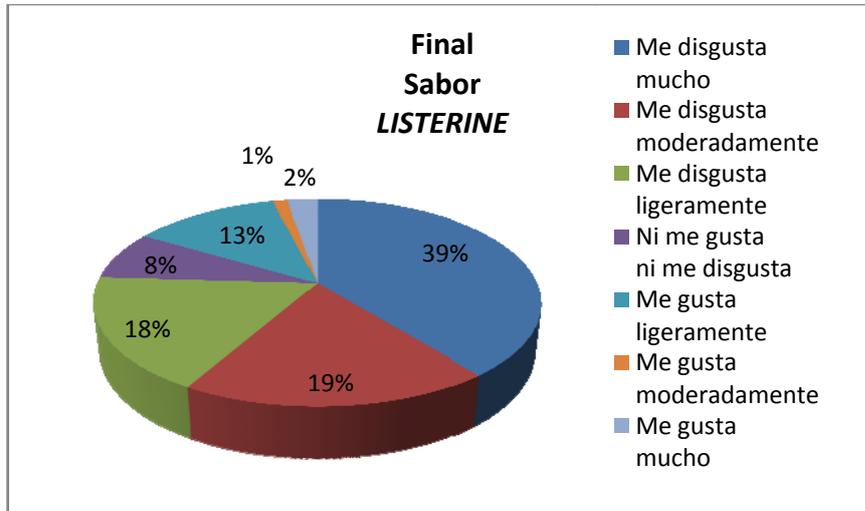
<sup>134</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 11. Calificaciones de Listerine durante la realización de buchadas<sup>135</sup>**



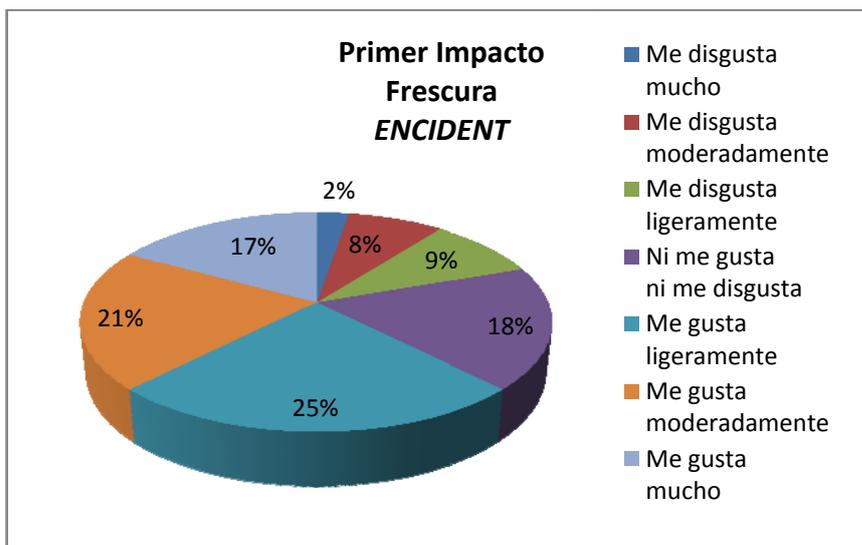
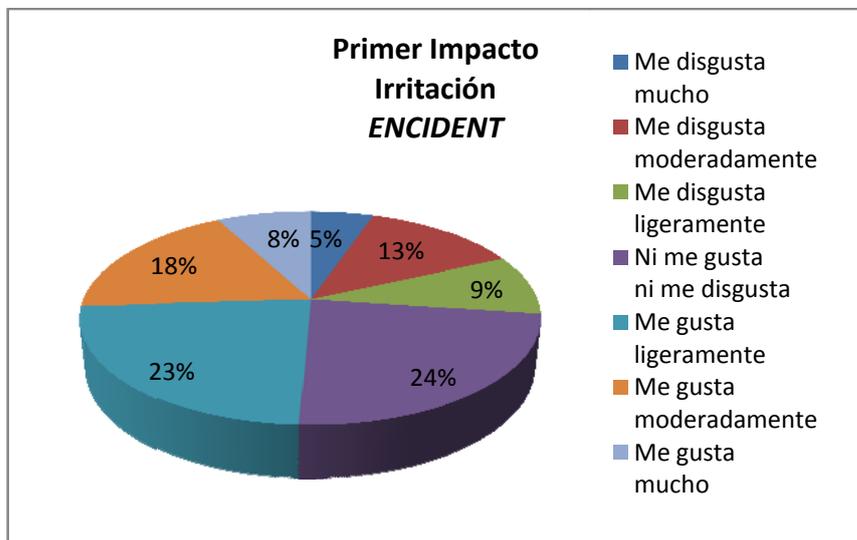
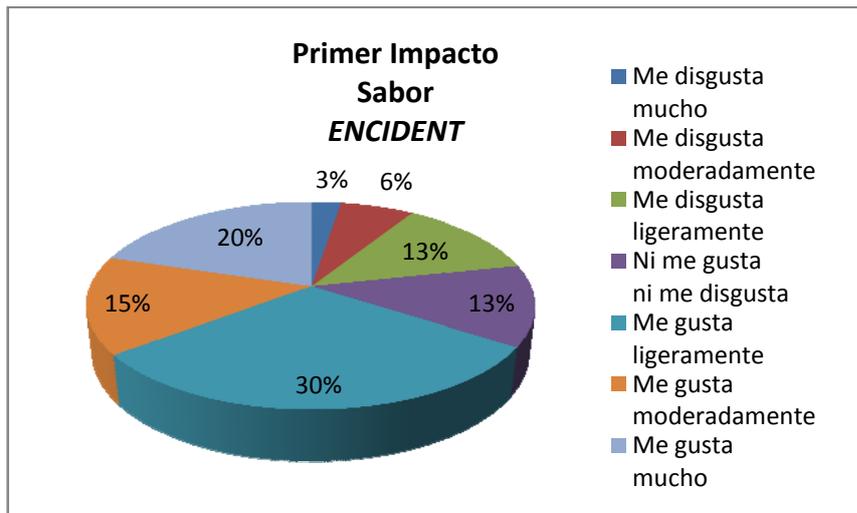
<sup>135</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

Anexo 12. Calificaciones de Listerine al Final de la Evaluación<sup>136</sup>



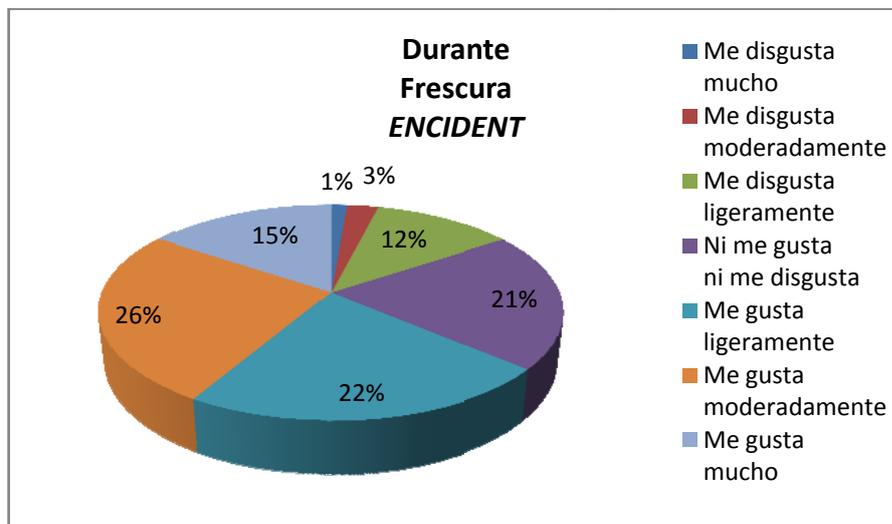
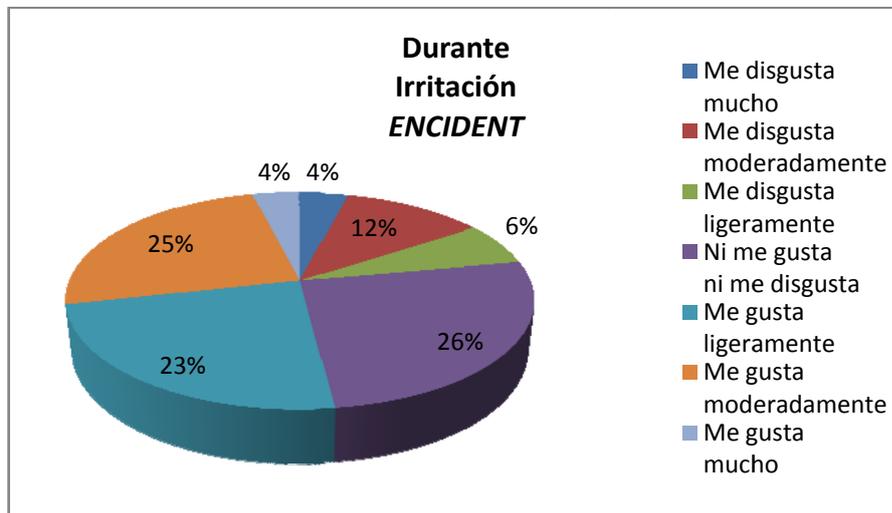
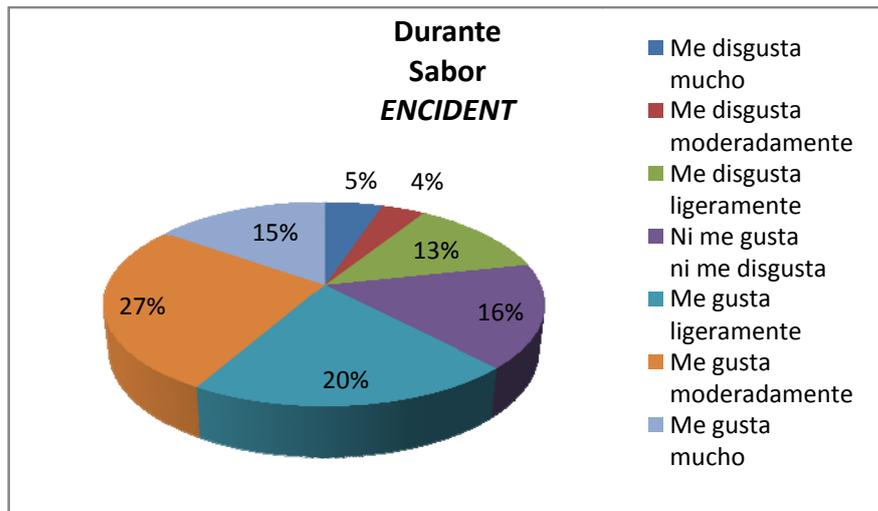
<sup>136</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 13. Calificaciones de Encident al Primer Impacto<sup>137</sup>**



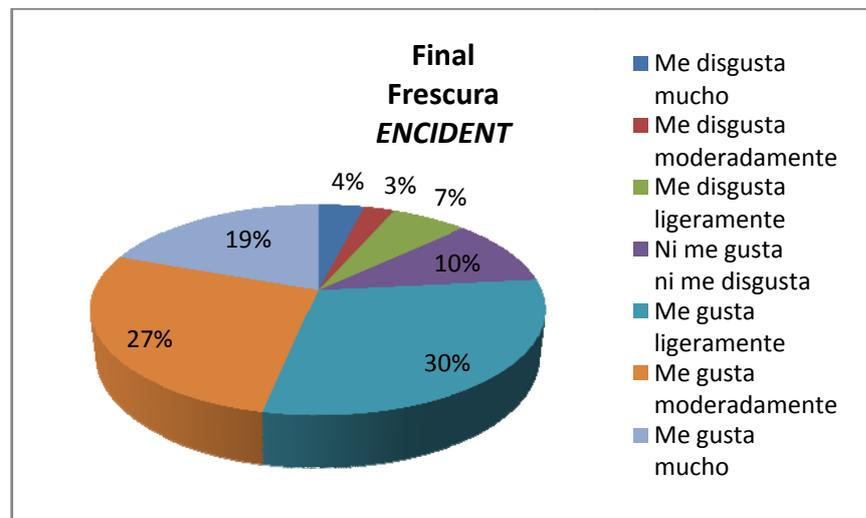
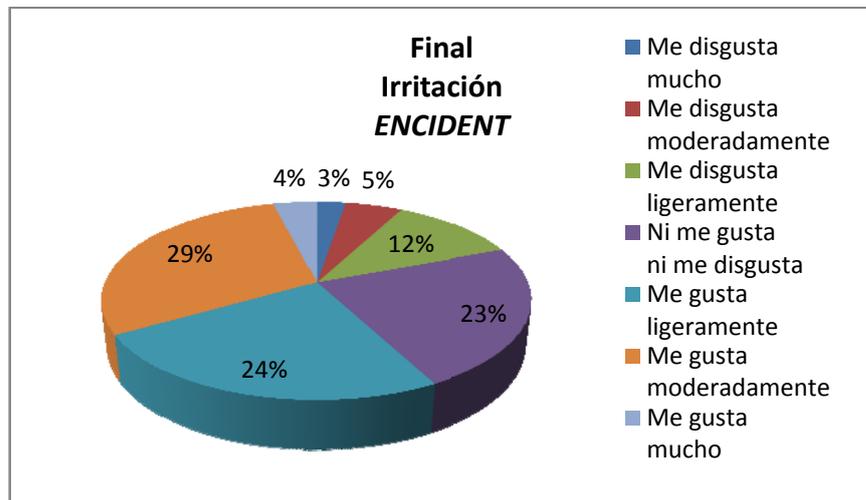
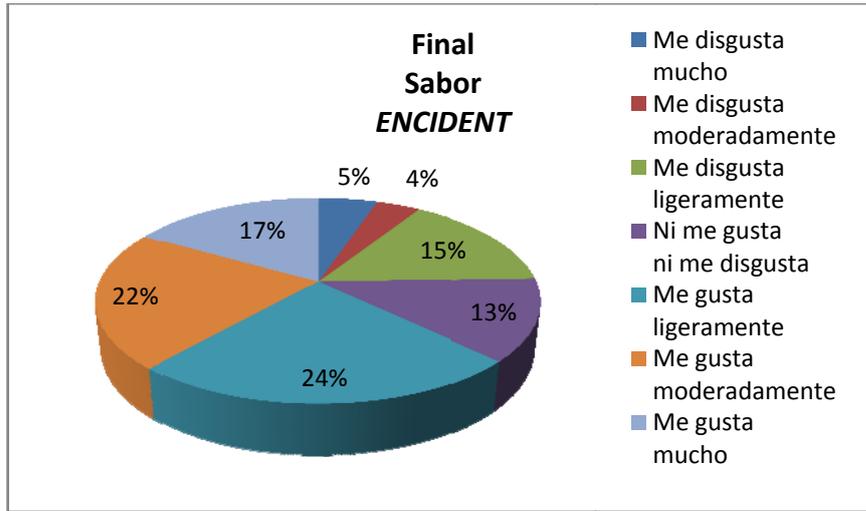
<sup>137</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 14. Calificaciones de Encident durante la realización de buchadas<sup>138</sup>**



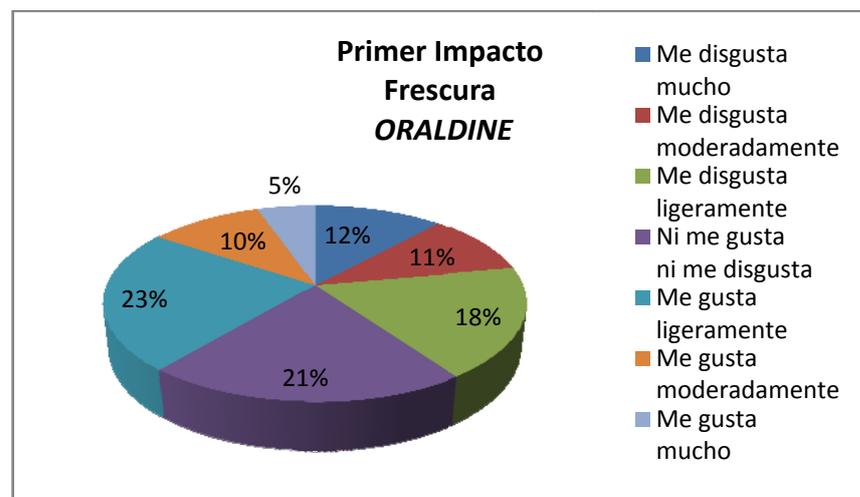
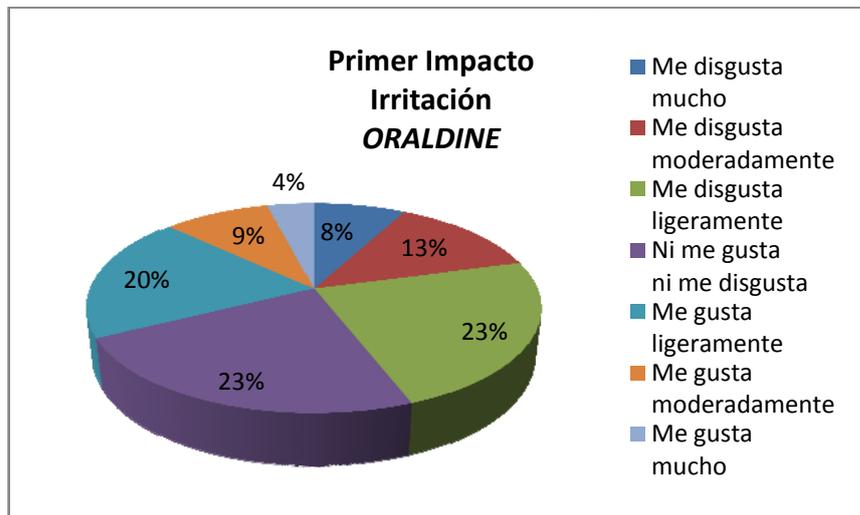
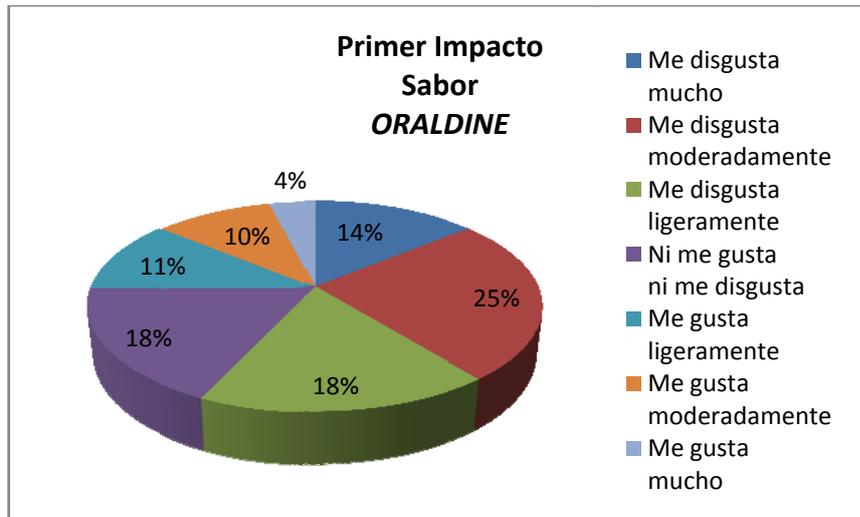
<sup>138</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

Anexo 15. Calificaciones de Encident al Final de la Evaluación<sup>139</sup>



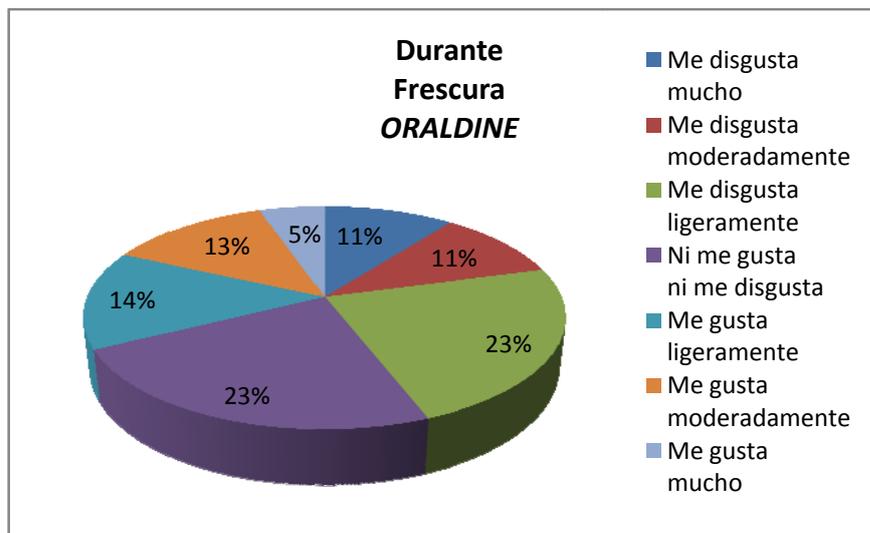
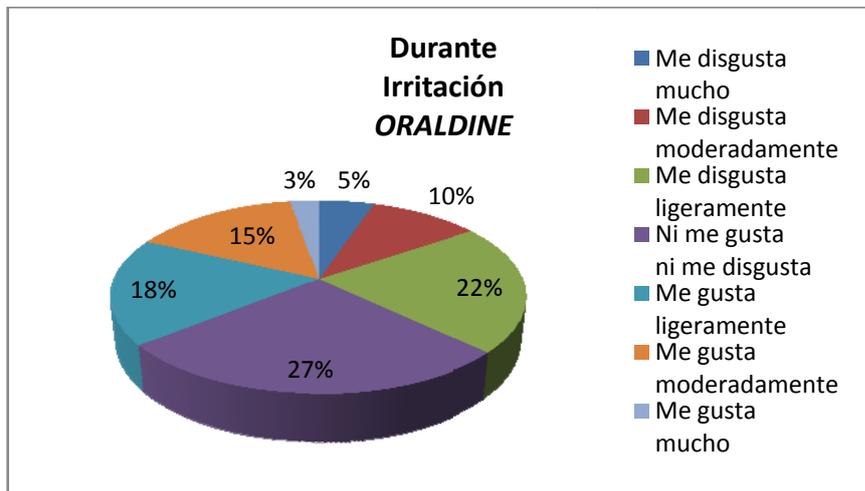
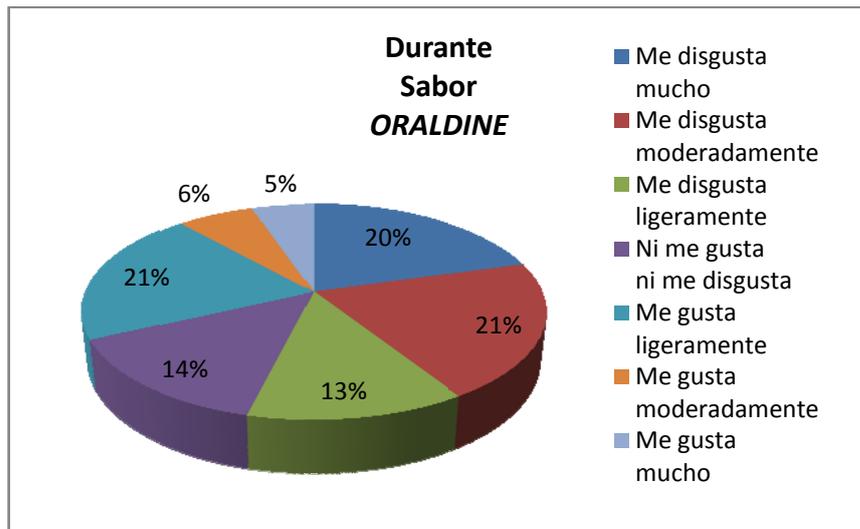
<sup>139</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 16. Calificaciones de Oraldine al Primer Impacto<sup>140</sup>**



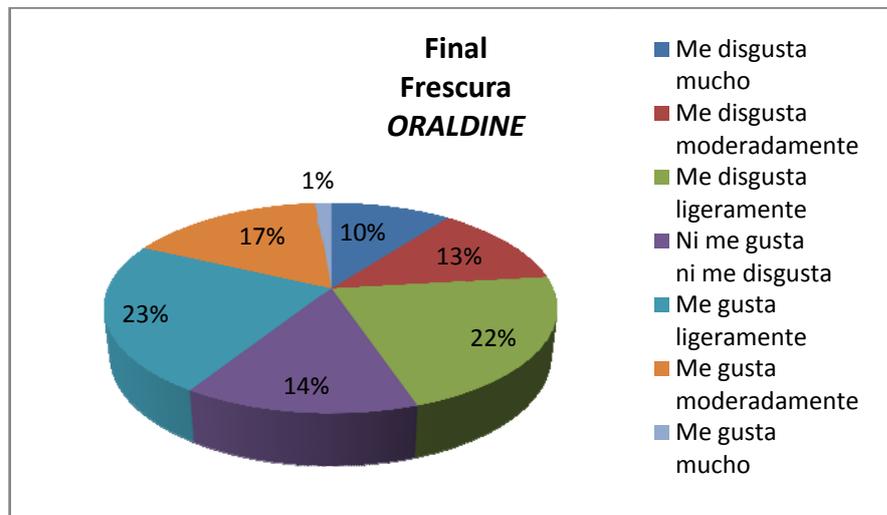
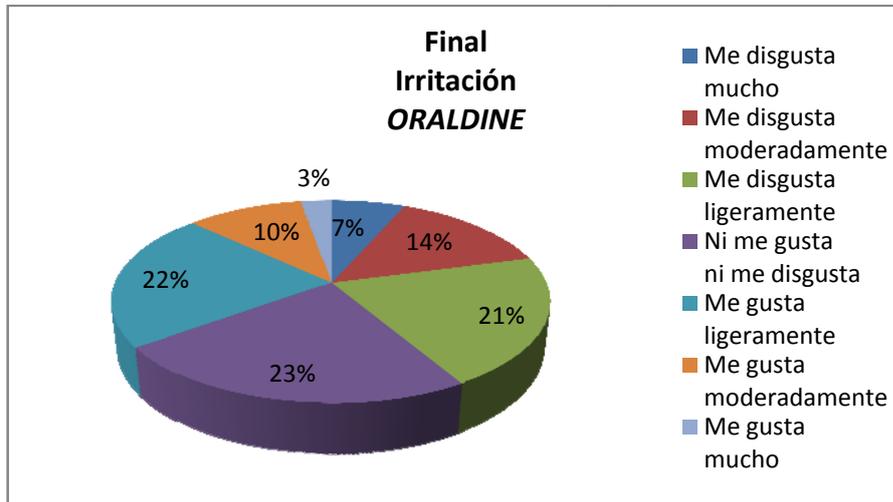
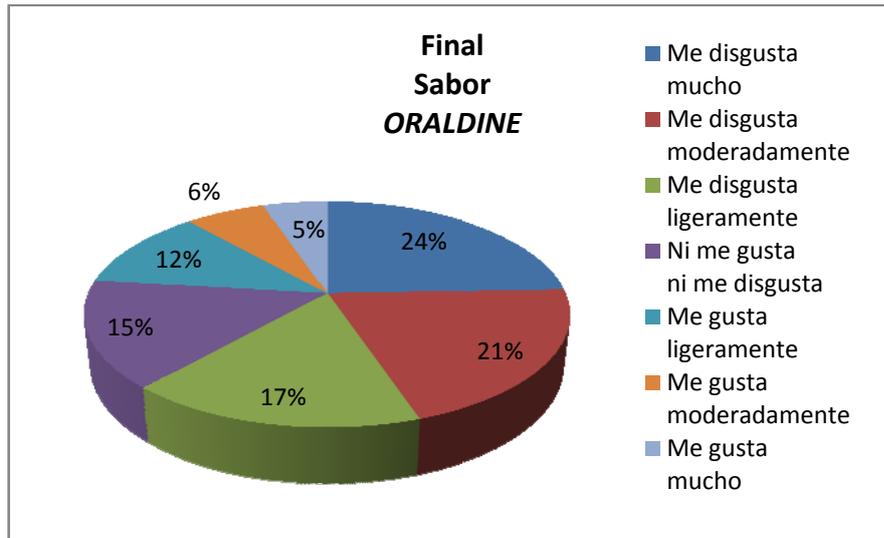
<sup>140</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 17. Calificaciones de Oraldine durante la realización de buchadas<sup>141</sup>**



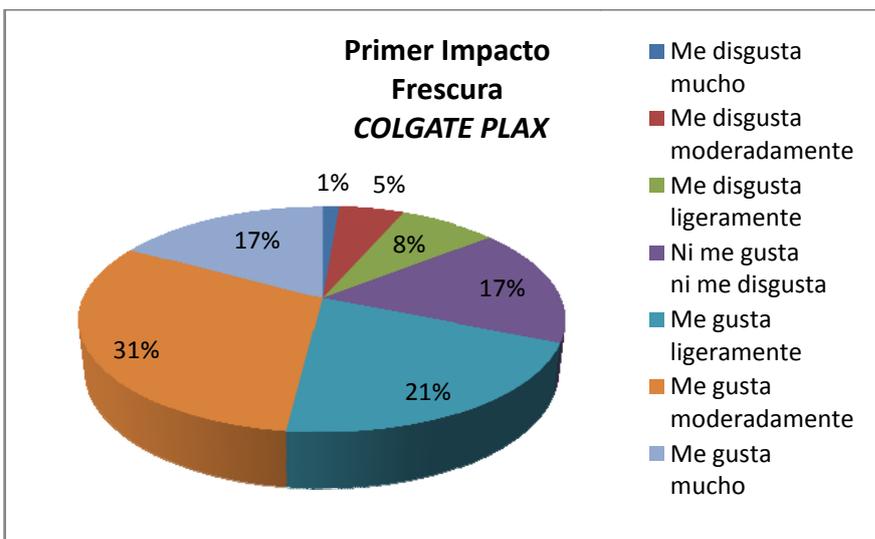
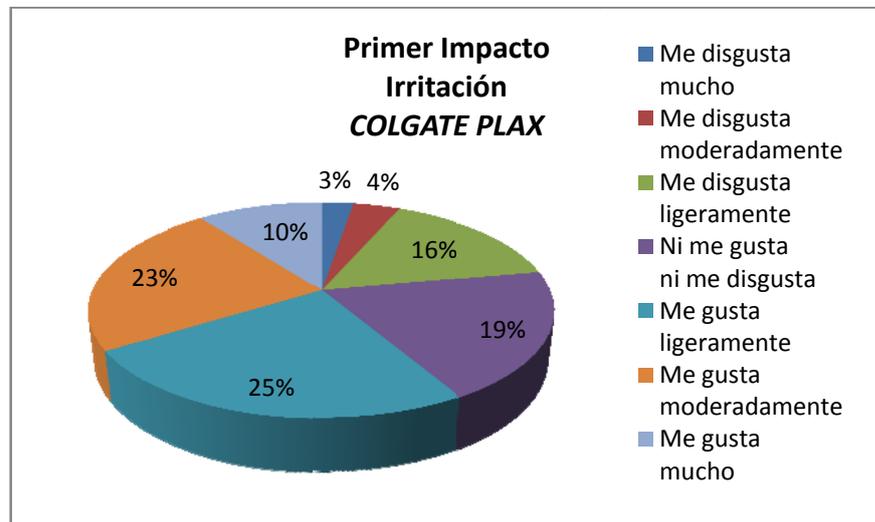
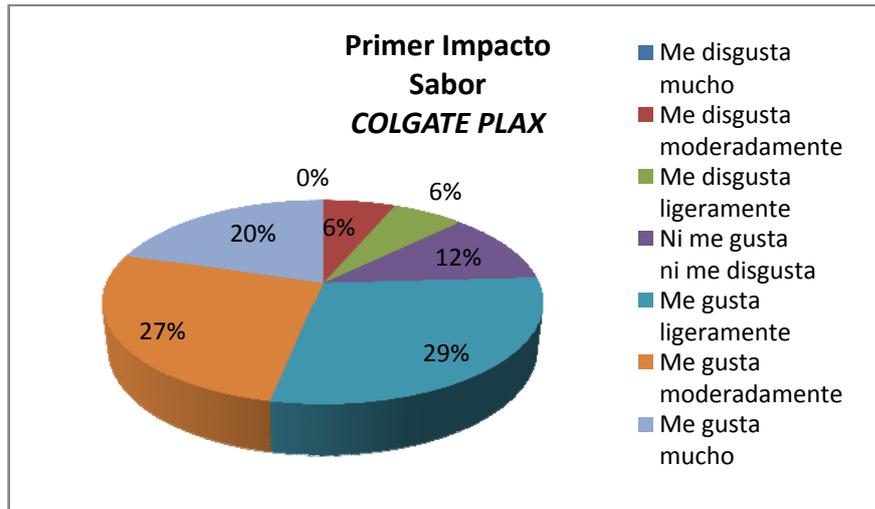
<sup>141</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 18. Calificaciones de Oraldine al Final de la Evaluación<sup>142</sup>**



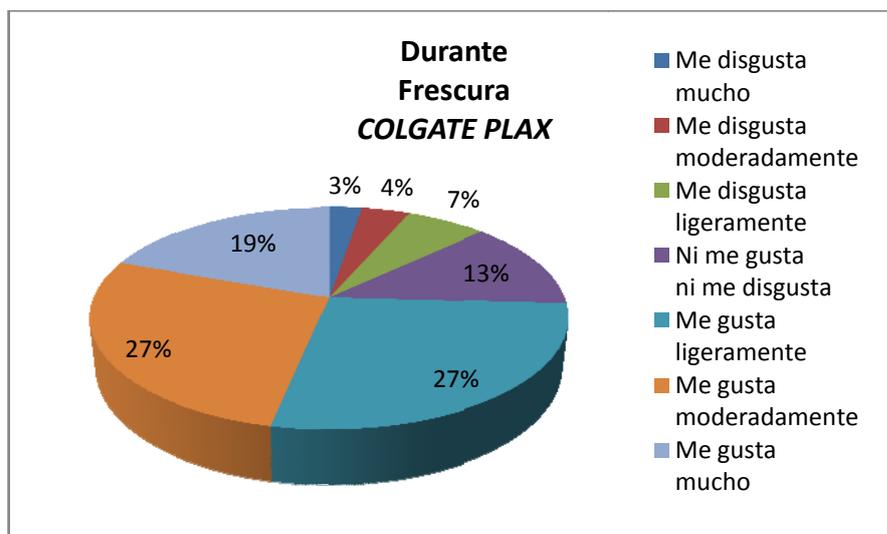
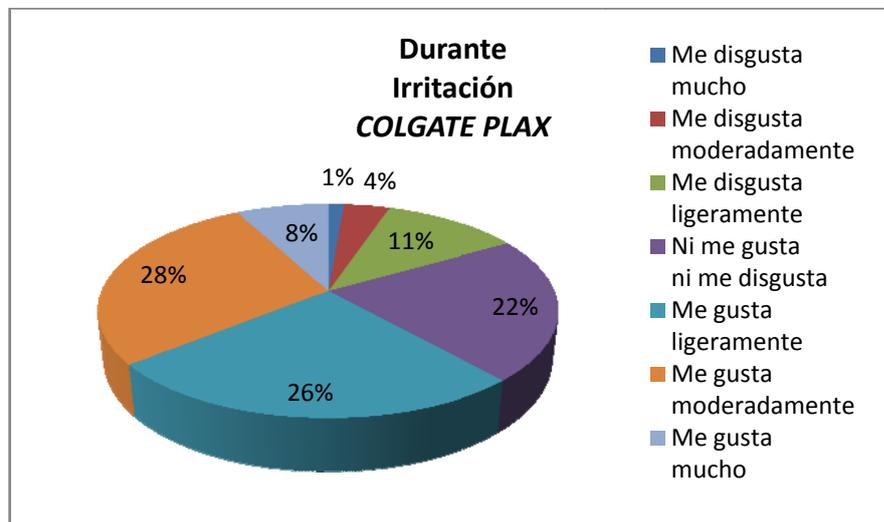
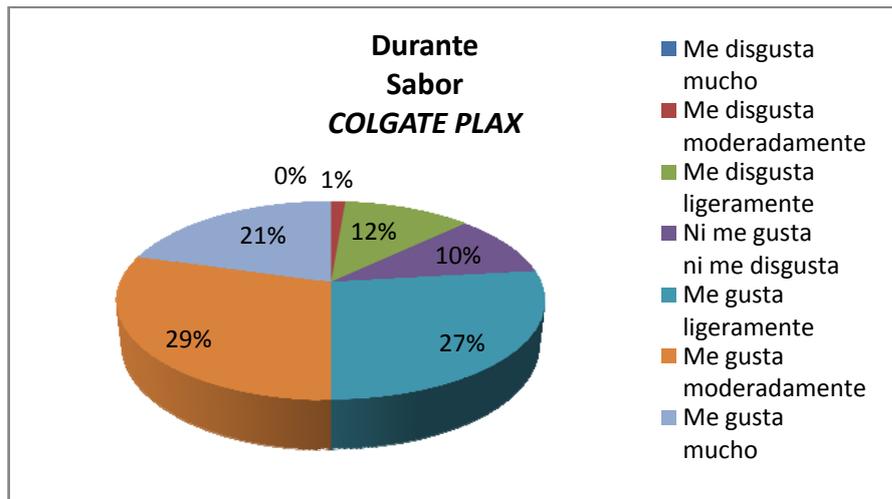
<sup>142</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 19. Calificaciones de Colgate Plax al Primer Impacto<sup>143</sup>**



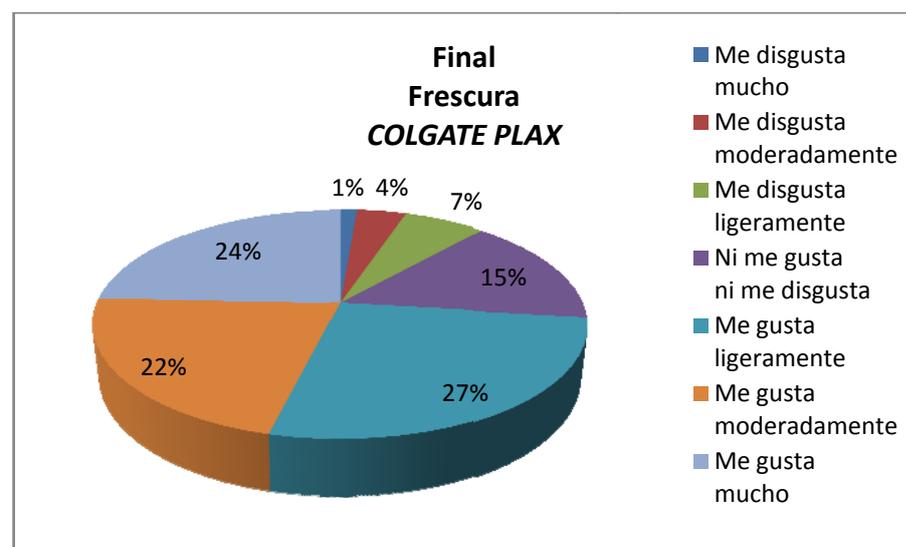
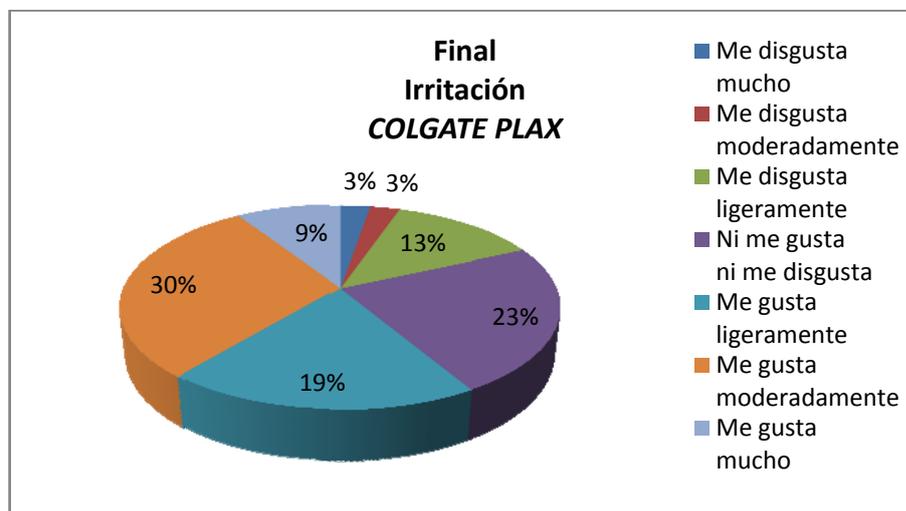
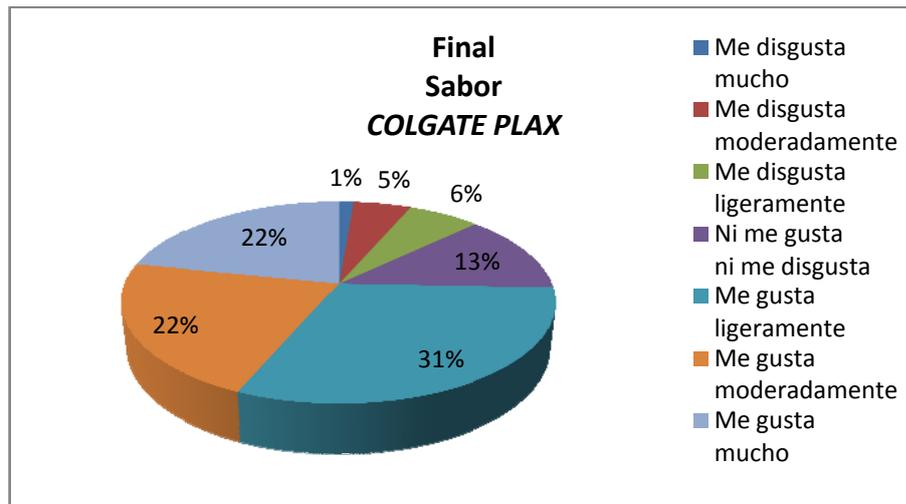
<sup>143</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 20. Calificaciones de Colgate Plax durante la realización de buchadas<sup>144</sup>**



<sup>144</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

**Anexo 21. Calificaciones de Colgate Plax al Final de la Evaluación<sup>145</sup>**



<sup>145</sup> Fuente: La autora, con base en evaluación sensorial hedónica

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABOITIZ, Carlos, *Flora bacteriana normal*, [en línea], 02/04/ 2008, actualizado 11/11/2008, [citado 08/08/2010], Formato html, disponible en Internet: <http://www.doctoraboitiz.com/pediatria/36-articulos-de-pediatria/114-flora-bacteriana-normal.html>
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA, *Guía de estabilidad de productos cosméticos*, Serie Calidad en Cosméticos, Segunda Edición, Volumen 1, Brasilia, Mayo 2005, ISBN – 85-88233-15-0
- AIEPI, *Módulo Salud Oral*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 14-04-2010], Organización Panamericana de la Salud, formato pdf, disponible en Internet: <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/si-oral1.pdf>
- ALONSO, Jorge, *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*, 1era Reimpresión, Editorial Corpus, Rosario-Argentina, 2007
- AÑANCA, Erick, *Efecto antibacteriano invitro del extracto acuoso de vainas de Caesalpinia spinosa (Tara) en cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes*, [en línea], Perú, 2009, [citado 29-10-2010], Tesis Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias Médicas, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.unjbg.edu.pe/tesis/pdf/tesis11.pdf>
- ARICAPA, Diana, *Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos*, [en línea], Bogotá, 2009, [citado 06-10-2010], Tesis Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Carrera de Bacteriología, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf>
- BASCONES, A y MORANTE, S, “Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual”, *Avances en periodoncia*, Vol 18, N° 1, España, Abril 2006, pp 31-59.
- BRUNETON, Jean, *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*, Segunda Edición, Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España, 2001
- BUENO, Mariano, *Fitoterapia*, [en línea], lugar de publicación desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 04-11-2010], Instituto de Medicina Biológica y Antienvejecimiento, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.biosalud.org/archivos/divisiones/4311Fitoterapia.pdf>, pp 1-9

- CAMEJO, Valentina, *Sensibilidad in vitro de Streptococcus mutans a sanguinaria, compuesto fenólico y clorhexidina*, Acta Odontológica Venezolana, Vol 37, N° 2, Venezuela, 1999, formato pdf, disponible en Internet: [http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/sensibilidad\\_in\\_vitro\\_streptococcus\\_mutans\\_a\\_sanguinaria\\_compuesto\\_fenolico\\_clorhexidina.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/sensibilidad_in_vitro_streptococcus_mutans_a_sanguinaria_compuesto_fenolico_clorhexidina.asp)
- CASTRO, Viviana, *Inhibición Del Crecimiento In Vitro De Streptococcus mutans por Papaina y Sanitrend*, [en línea], Santiago-Chile, 2005, [citado 12-06-2010], Tesis Universidad de Chile, Facultad de Odontología, formato pdf, disponible en: [http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/castro\\_v/sources/castro\\_v.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/castro_v/sources/castro_v.pdf)
- CUMBREÑO, Soledad y PÉREZ, Francisco, *Procedimientos Normalizados De Trabajo– Pn/L/Ff/007/00*, Offarm, Vol 23, N° 9, Octubre 2004, pp 156-158.
- CYTED, *Manual de Técnicas de Investigación*, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma X: Química Fina Farmacéutica, Proyecto X-1: Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región, 1995
- DOMINGO, D y LÓPEZ-BREA, M, “Plantas con acción antimicrobiana”, *Rev Esp Quimioterap*, Vol 16, N°4, España, Diciembre 2003, pp 385-393
- FIGUEROA-GORDÓN, M, ALONSO, G y ACEVEDO, A, “Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental”, *Acta Odontológica Venezolana*, Vol 47, N° 1, Venezuela, 2009, ISSN: 0001-6365, pp 1-13.
- GAMAZO, Carlos y otros, *Manual práctico de Microbiología*, 3ra Edición, Masson S.A., Barcelona-España
- GORDILLO, R y otros, “Sensibilidad de aislamientos faríngeos de Streptococcus pyogenes en la provincia de Córdoba (España)”, Prous Science S.A.-Sociedad española de Quimioterapia, *Rev Esp Quimioterap*, Vol 16, N°1, España, Marzo 2003.
- GRANADOS, Raquel y VILLAVERDE, M, *Microbiología Tomo II*, Segunda Edición, Thomsom Editores, Paraninfo S.A., España, 2002
- GUADRÓN, José, *Efecto sobre la placa bacteriana de los antisépticos bucales*, [en línea], El Salvador, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer, Facultad de Cirugía Dental, 2007, [citado 22-05-2010], formato pdf, disponible en Internet: <http://www.usam.edu.sv/SiteUmasferrer/InvetigacionInstitucional/Enjuagues%20bucales.pdf>

- GUERRA, Juan, *Microbiología bucal*, [en línea], Bolivia, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 08-08-2010], formato pdf, disponible en Internet: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa93020213.pdf>
- GUILARTE, C. y PERRONE, M. *Microorganismos de la placa dental relacionados con la Etiología de la Periodontitis*, [en línea], Venezuela, 2004, Acta odontológica Venezolana, Vol 42, N° 3, formato pdf, disponible en Internet: [http://www.actaodontologica.com/ediciones/2004/3/microorganismos\\_placa\\_dental\\_etiologia\\_periodontitis.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/2004/3/microorganismos_placa_dental_etiologia_periodontitis.asp)
- KUKLINKSKI, Claudia, *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*, Primera reimpresión, Ediciones Omega, Barcelona-España, 2000
- LAHOUD, Víctor, *Placa Bacteriana*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 21-09-2010], Revista Odontológica, U.N.M.S.M., formato pdf, , disponible en Internet: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rev\\_cientifica/n04\\_1994/pdf/a06.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rev_cientifica/n04_1994/pdf/a06.pdf)
- LIÉBANA, José, *Estabilidad de genotipos de Streptococcus mutans en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-2*, [en línea], Granada, Editorial de la Universidad de Granada, 2008, [citado 24-10-2010], Tesis Universidad de Granada, Facultad de Odontología, formato pdf, disponible en Internet: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1836/1/17366768.pdf>, ISBN 978-84-338-4915-1
- LLENA-PUY, Carmen, “The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis”, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006; 11: E449-55. © Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946
- MEDINA, Rosalba y otros, “Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del Streptococcus mutans ATCC 25175 “in vitro””, *Revista Nova*, Vol 3, N° 3, ISSN 1794-2470, Colombia, Enero-Junio 2005, pp 25-30
- MONTEQUI, S y SANTOS, J.C, “Infecciones bacterianas de vías altas: Otitis, amigdalitis”, *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*, Vol 46, Suplemento 2, España, 2006, pp 294-303.
- MUÑOZ, María José, *Higiene bucodental. Pastas dentríficas y enjuagues bucales*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 19-05-2010], Dermofarmacia, formato pdf,

- disponible en Internet:  
[http://www.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=15465&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=04v19n03a03008pdf001.pdf&ty=75&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://www.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=15465&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=04v19n03a03008pdf001.pdf&ty=75&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es)
- NORIEGA, Paco y DACARRO, Cesare, “Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica”, *La Granja*, Vol 7, N° 1, Ecuador, Julio 2008, pp. 3-8
- PEDRERO, Daniel y PANGBORN, Rose, *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*, Primera Edición, Editorial Alhambra Mexicana, México D.F., 1989
- PEREZ, Ada, “La Biopelícula: una nueva visión de la placa dental”, *Rev Estomatol Herediana*, 2005; 15(1): 82 - 85
- PLATT, Cristina, y otros, *Uso de los diferentes agentes químicos para el control de la placa bacteriana como coadyuvantes en la prevención de las enfermedades gingivales*, [en línea], Venezuela, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 27-05-2010], ODOUS Científica, Revista de la Facultad de Odontología, Universidad de Carabobo, formato pdf, disponible en Internet: <http://servicio.cid.uc.edu.ve/odontologia/revista/v5n1/5-1-2.pdf>
- PORTILLA, J. y col., “Conceptos actuales e investigaciones futuras en el tratamiento de la caries dental y control de la placa bacteriana”, *Revista Odontológica Mexicana*, Vol 14, N° 4, México, Diciembre 2010, pp 218-225.
- RIVERA, Maribel, “Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*)”, *Honduras Pediátrica*, Volumen XIX, N°2, Honduras, Abril, Mayo, Junio 1998, pp 47-51
- ROMERO, Melissa, HERNANDEZ, Yrasema y GIL, Marielsa, *Actividad inhibitoria de la *Matricaria recutita* “Manzanilla Alemana” sobre el *Streptococcus mutans**, [en línea], Caracas, fecha de publicación desconocida, [citado 16-06-2006], Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría, formato pdf, disponible en Internet: <http://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp>, ISSN: 1317-5823, pp 1-13
- RUIZ, Carmen, *Prevalencia de *Streptococcus beta hemolítico del grupo A*, en niños con faringoamigdalitis aguda bacteriana y niños sanos*, [en línea], Guatemala, Enero 2003, [citado 29-10.2010], Tesis Universidad Francisco Marroquín,

- Facultad de Medicina, formato pdf, disponible en Internet:  
<http://www.tesis.ufm.edu.gt/pdf/3538.pdf>
- s/a, “Placa dentobacteriana”, *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, Vol 60, N° 1, México, Enero-Febrero 2003, pp 34-36
- s/a, *Métodos de laboratorio para ensayos de sensibilidad de bacterias frente a antimicrobianos*, Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004, [citado 21-11-2010], formato pdf, disponible en Internet:  
[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/1.1.10\\_Metodos\\_de\\_laboratorio.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/1.1.10_Metodos_de_laboratorio.pdf)
- s/a, *Refractómetro*, [on line], fecha de publicación desconocida, [citado 28-11-2010], formato pdf, disponible en Internet:  
[http://tabay.unam.edu.ar/aulavirtual/moodledata/2/REFRACTOMETRO\\_Equipo.pdf](http://tabay.unam.edu.ar/aulavirtual/moodledata/2/REFRACTOMETRO_Equipo.pdf)
- SAVIO, Eduardo y otros, *Guías de Tratamiento Infecciones Respiratorias*, [en línea], Montevideo, UDELAR, Agosto 2005, [citado 22-08-2010], formato pdf, disponible en Internet:  
[http://www.clinfec.fmed.edu.uy/pautas/pdfs/GuiaTToIR205\\_1.pdf](http://www.clinfec.fmed.edu.uy/pautas/pdfs/GuiaTToIR205_1.pdf), ISSN 1510-9380, pp 1-19
- SUÁREZ, Susana, *Composición microbiana de las placas dentales*, [en línea], lugar de publicación desconocido, editor desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 16-05-2010], formato html, disponible en Internet:  
<http://microral.wikispaces.com/Microbiolog%C3%ADa+de+las+placas+bacterianas+dentales>.
- VELAZQUES, María Eugenia y GONZÁLEZ, Olga, “La Halitosis. Definición, clasificación y factores etiológicos”, *Acta Odontológica Venezolana*, Vol 44, N° 2, Venezuela, 2006
- ZEKARIA, Dan, *Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos*, [en línea], lugar de publicación desconocido, fecha de publicación desconocida, [citado 20-10-2010], Laboratorios Calier, formato pdf, disponible en Internet:  
[http://www.calier.es/pdf/Microsoft\\_Word\\_-\\_Aceites\\_esen\\_como\\_promotores.pdf](http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_-_Aceites_esen_como_promotores.pdf), pp 1-6