

Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre el Crecimiento *in Vitro* de *Streptococcus mutans*, 2015

Antibacterial Effect of Oregano Infusion (*Origanum vulgare*)
on *in Vitro* Growth of *Streptococcus mutans*, 2015

Alexandra Schovelin H.¹ & Marlene Muñoz C.²

SCHOVELIN, H. A. & MUÑOZ, C. M. Efecto antibacteriano de la infusión de orégano (*Origanum vulgare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*, 2015. *Int. J. Odontostomat.*, 12(4):337-342, 2018.

RESUMEN: El *Streptococcus mutans* es una de las principales bacterias que participa en el desarrollo de la caries dental, una enfermedad de alta prevalencia en la población mundial, y por ende un problema de salud pública. Hoy se intentan buscar alternativas para su prevención, una de ellas es la fitoterapia o uso de plantas medicinales con fines terapéutico beneficiosos para la salud. Evaluar efecto antibacteriano del *Origanum vulgare* a diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. Se utilizaron cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* previamente aisladas, se realizó una siembra bacteriana en 24 placas Petri con *agar mitis salivarius*. Se prepararon infusiones de orégano a 8 concentraciones diferentes (1 %, 5 % y 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %) y se aplicaron en perforaciones realizadas previamente en las placas de agar (4 perforaciones por placa para las infusiones de orégano y 2 para las placas de controles). Se llevó a incubadora por 48 horas y posteriormente se realizó la medición de los halos de inhibición. Los resultados fueron negativos para las infusiones de orégano al 1 %, 5 % y 10 %, debido a que no presentaron halos de inhibición bacteriana; mientras que para las infusiones al 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 % los resultados fueron positivos. El orégano posee efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en infusiones sobre el 20 % de concentración, siendo la solución madre preparada a partir de 20 gramos de hojas secas de orégano (*Origanum vulgare*) y 200 ml de agua destilada hervida. Este efecto es antibacteriano es directamente proporcional a la concentración de la infusión. El orégano podría ser utilizado como una alternativa de colutorio, pasta dental u otros coadyuvantes de higiene bucal para prevenir la aparición de caries.

PALABRAS CLAVE: orégano (*Origanum vulgare*), efecto antibacteriano, *Streptococcus mutans*, caries.

INTRODUCTION

Las enfermedades bucodentales más frecuentes a nivel mundial son la caries dental y las periodontopatías (Organización Mundial de la Salud, 2007). Estas son las enfermedades crónicas más comunes y un importante problema de Salud Pública por su alta prevalencia, impacto en los individuos y en la sociedad. La prevalencia de la caries aumenta sostenidamente con la edad, llegando casi al 100 % en la población adulta (Ministerio de Salud, 2007). Además la atención odontológica curativa tradicional representa una importante carga económica para el individuo y la sociedad. Adicionalmente la salud dental afecta la calidad de vida, el funcionamiento social,

limita a las personas en su desempeño público y se vincula a la segregación laboral (Organización Mundial de la Salud).

La realidad terapéutica hoy en día, está regida por la química sintética, que en su mayoría son copias mejoradas de sustancias químicas que la naturaleza creó. Dentro de estas sustancias se encuentra la clorhexidina, antiséptico oral ampliamente utilizado en prevención, al reducir la placa dental y la gingivitis, posee efectos adversos asociados al uso prolongado, también provoca alteración del gusto (Bascones & Morante, 2006).

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Desarrollo, Concepción, Chile.

² Licenciada en Ciencias Biológicas, Magister en Ciencias mención Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Desarrollo, Concepción, Chile.

En la actualidad se ha observado un especial interés por el empleo de plantas medicinales en los países desarrollados del mundo occidental (Avello & Cisternas, 2010). Dentro de las plantas con propiedades terapéuticas que se utilizan en fitoterapia (terapia complementaria que utiliza plantas o partes de ellas con fines terapéuticos) se encuentra el orégano (*Origanum vulgare*). Esta planta pertenece a la familia de las Lamiaceae o Labiadas (Hoffmann *et al.*, 1992). Es una hierba muy aromática originaria de la cuenca del mediterráneo, es decir, de Europa y Asia. Se cultiva en regiones templadas de varios países, como plantas medicinales y para condimentar comidas.

Posee un aceite esencial que contiene dos fenoles que son el carvacrol (0,1-30 %) y el timol (50 %), flavoides derivados del apigenol, luteolol, kenferol, diosmetol. Además contiene otros compuestos como estragol, eugenol, taninos, entre otros (Fonnegra & Jiménez, 2007). El *Origanum vulgare* posee alto contenido en compuestos polifenólicos (Amadio *et al.*, 2011), y la mayor parte de las propiedades curativas se atribuyen al aceite esencial y flavonoides (Kaurinovic & Popovic, 2012).

El orégano se emplea como antiséptica, expectorante, antibacteriano, antiviral y antifúngico, antiespasmódico, antiinflamatorio, diurético, sedante, antirreumático, contra dolores musculares, otalgias y odontalgias, entre otros (Hoffmann *et al.*). Según el estudio de Albado Plaus *et al.* (2001), el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positivas y gram negativas. Se sabe que *Streptococcus mutans* es la especie bacteriana más importante que participa en el desarrollo inicial de la Caries y pertenece al grupo gram positivo. Además, a mayor grado de infección por *Streptococcus mutans* en saliva, existe mayor riesgo a padecer de caries (Gispert Abreu *et al.*, 2000). Por lo anterior resultaría importante relacionar la fitoterapia con la odontología, respecto a una disminución de la prevalencia de la caries dental. Es por lo anterior que en este estudio se pretende determinar el efecto antibacteriano de la infusión de *Origanum vulgare* a diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* de este microorganismo.

MATERIAL Y MÉTODO

En esta investigación se realizó un estudio cuantitativo experimental. Todos los instrumentos utilizados fueron previamente esterilizados y manipulados

bajo normas de bioseguridad. Todas las placas fueron preparadas de la misma forma y asignadas aleatoriamente a distintos tratamientos.

Por cada grupo de tratamiento, la muestra mínima necesaria fue de 4 réplicas. Sin embargo, se realizaron más de 8 réplicas por grupo de tratamiento para aumentar la certeza de los datos del estudio en caso de error. El control positivo correspondió a Clorhexidina al 0,12 % y el control negativo correspondió a agua destilada estéril. Además se prepararon diluciones de la infusión de orégano a 8 concentraciones diferentes (1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %), siendo la solución madre preparada a partir de 20 gramos de hojas secas de orégano (*Origanum vulgare*) y 200 ml de agua destilada hervida. Por lo anterior se utilizaron 24 placas con *agar mitis salivarius* con 80 perforaciones (4 perforaciones por placa para las diluciones de orégano y 2 perforaciones para los grupos controles).

Se prepararon 24 placas con *agar mitis salivarius*, para lo cual se pesaron en un vaso precipitado estéril, en la pesa electrónica, 21,6 g de *agar mitis salivarius* en polvo Loba Chemie® y 5,4 g de sacaros; luego se midieron 300 ml de agua destilada estéril en una probeta de 500 ml. Lo anteriormente medido se mezcló en un matraz Enlenmeyer de 500 ml autoclavable y se agito con una bagueta para disolver los componentes. Luego se utilizó un tapón de algodón hidrófobo y se cubrió con papel craf sellado con una cinta indicadora de esterilización. Posteriormente se llevó el *agar* al autoclave a 121°C por 57 minutos. Una vez enfriado a temperatura ambiente, el *Agar* se trasladó a una campana previamente desinfectada con alcohol al 70 %, para aplicar 20 ml de *Agar* a cada placa Petri estéril. Se deja secar a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas para luego refrigerar.

Se utilizaron cepas de bacterias *Streptococcus mutans* del laboratorio de la Universidad Del Desarrollo. Se obtuvo la bacteria de un cultivo y con un asa de siembra previamente flameada en un mechero se traspasó a un tubo de ensayo estéril con 10 ml de agua destilada estéril. Se ajustó la suspensión por comparación visual hasta llegar a ser 2 o 3 veces superior a la del tubo estándar de solución de McFarland al 0,5 %. Lo anterior indica que hay una cantidad de UFC (unidad formadora de colonias) mayor a 1x10⁸ por ml. Al comparar ambas suspensiones bien agitadas por un vortex se logra estandarizar las muestras bacterianas y trabajar con una concentración idéntica.

A continuación se realizó la siembra bacteriana de las placas de agar con tómulas de algodón estériles y se diseminó el inóculo bacteriano por toda la superficie de la placa en forma de barrido para generar un tapiz bacteriano. Luego se realizó con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro, 10 perforaciones en 3 placas Petri (en la primera placa se realizaron 2 perforaciones para los controles positivo y negativo, en la segunda placa se colocaron las concentraciones al 1 %, 5 %, 10 % y 20 %; y en la tercera placa se colocaron las concentraciones al 40 %, 60 %, 80 % y 100 %). Este procedimiento se repitió 8 veces.

La infusión se preparó a partir de 20 g de hojas secas de orégano (*Origanum vulgare*) y 200 ml de agua destilada hervida que se dejó reposar unos minutos y luego se filtró en un matraz de Kitasato para filtrar esta solución y eliminar bacterias y esporas de hongos que pudieran haber estado presentes para no alterar los resultados. Con lo anterior se obtuvo la infusión al 100 % de concentración. Luego esta infusión fue diluida con agua destilada estéril para obtener las distintas diluciones a diferentes concentraciones (1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %) y estas fueron almacenadas en tubos de ensayos esterilizados, cubiertos por algodón hidrofóbico estéril hasta su utilización experimental.

Posteriormente en cada perforación se agregaron 50 mL de los respectivos tratamientos en estudio (control positivo, control negativo y con las diferentes concentraciones de las infusiones a las distintas concentraciones experimentales).

Por último se colocaron las placas en jarras de anaerobiosis, para lograr esto se insertó una vela encendida para eliminar la presencia de oxígeno, y se colocó en una incubadora a 37 °C por 48 h para su crecimiento. Posteriormente se retiraron las placas de las jarras de anaerobiosis y se realizó la medición del halo de inhibición con pie de metro.

Los datos fueron tabulados en M.S. Excel luego se exportaron a SPSS 15.0. El análisis descriptivo se realizara mediante diagrama de cajas y bigotes. Se calcularan promedios, desviación estándar, mediana, valor mínimo y máximo.

RESULTADOS

En la Tabla I se presentan los valores de los halos de inhibición en mm, generados por las diferentes concentraciones de las infusiones de *Origanum vulgare* y de los grupos controles sobre *Streptococcus mutans*. Como se esperaba, el control negativo que corresponde a agua destilada estéril, no generó halos de inhibición (0 mm). Mientras que el control positivo que corresponde a la clorhexidina al 0,12 % presenta halos superiores a los 13 mm de diámetro. Respecto de las concentraciones experimentales trabajadas, la concentración mínima inhibitoria de las infusiones de orégano se logra al 20 %.

En la Figura 1 se observa en la placa de la izquierda, los controles negativo y positivo. El control negativo realizado con agua destilada estéril no presenta halo de inhibición mientras que el control positivo realizado con clorhexidina al 0,12 % si presenta halo de in-

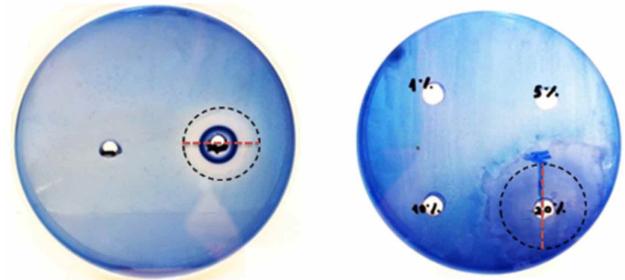


Fig. 1. Placas experimentales con controles negativo (agua destilada estéril) y positivo (clorhexidina al 0,12 %), y con concentraciones de la infusión de orégano al 1 %, 5 %, 10 % y 20 %.

Tabla I. Actividad inhibitoria (halos de inhibición) según la concentración de diluciones de *Origanum vulgare* (%) sobre *Streptococcus mutans* (valores en milímetros).

C-	C+	1%	5%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
0	14	0	0	0	15	14	19	26	25
0	14	0	0	0	14	20	20	21	24
0	18	0	0	0	12,5	19	22	23	22
0	17	0	0	0	13	18	20	23	31
0	13	0	0	0	15	19	16	19	25
0	13	0	0	0	13	19,5	20	22,5	28
0	14	0	0	0	13,5	16	20	23	24
0	15	0	0	0	18	19,5	21	23	27

*C-: agua destilada. *C+: clorhexidina al 0,12 %

hibición. En la placa de la derecha se observa las concentraciones de la infusión de orégano al 1 %, 5 %, 10 % y 20 %, además se aprecia que a partir del 20 % de concentración se observa halo de inhibición.

En la Figura 2 se observa la placa con las concentraciones de infusión de orégano al 40 %, 60 %, 80 % y 100 %, en todas hay halo de inhibición y además se aprecia que el mayor halo de inhibición se obtiene al 100 % de concentración de la infusión de orégano.

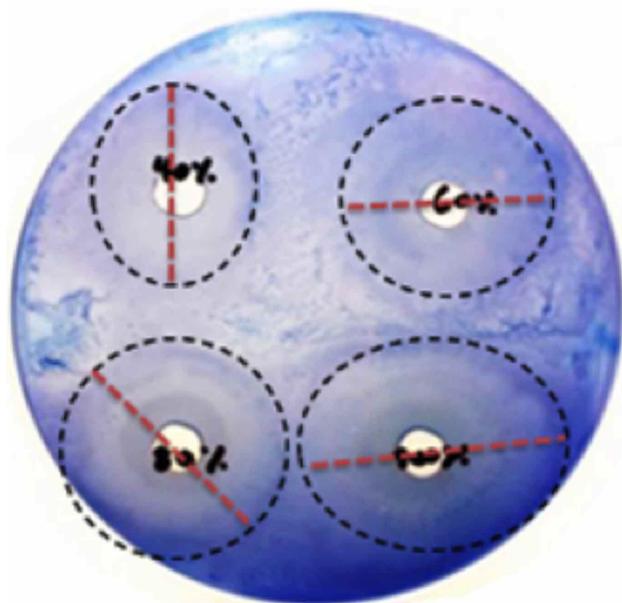


Fig. 2. Placa experimental con concentraciones de la infusión de orégano al 40 %, 60 %, 80 % y 100 %

En la Tabla II y en la Figura 3 se observa que el control negativo (C-), las concentraciones al 1 %, 5 % y 10 % no presentaron halos de inhibición. A partir del 20 % de concentración se aprecian halos de inhibición. A medida que aumenta la concentración de la infusión de orégano, se encontraron mayores halos de inhibición. La concentración al 100 % presentó los mayores halos de inhibición con un promedio de 25,75 mm, pero también presentó la mayor desviación estándar. Como se aprecia en la Tabla III, el control positivo (Clorhexidina al 0,12 %) presentó halos de inhibición con un promedio de 14,75 mm.

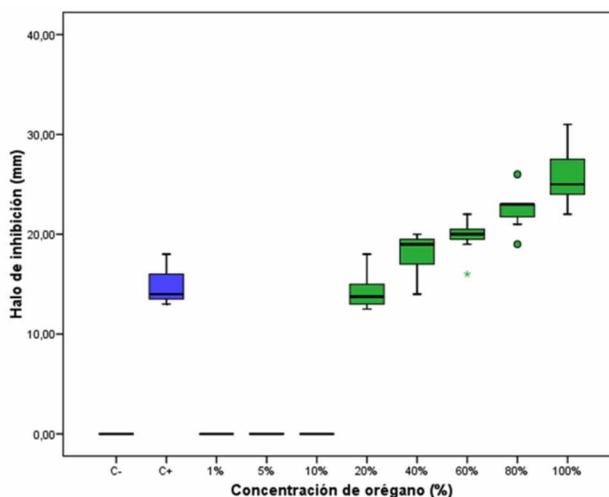


Fig. 3. Halos de inhibición (mm) sobre *Streptococcus mutans* según las diversas concentraciones de las infusiones de *Origanum vulgare*.

Tabla II. Análisis descriptivo de la actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* según la concentración de la dilución de *Origanum vulgare* (valores en mm).

	N	Media	Mediana	D.E.	Min.	Max.
Agua (C-)	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1%	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5%	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10%	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20%	8	14,25	13,75	1,77	12,50	18,00
40%	8	18,13	19,00	2,08	14,00	20,00
60%	8	19,75	20,00	1,75	16,00	22,00
80%	8	22,56	23,00	1,99	19,00	26,00
100%	8	25,75	25,00	2,82	22,00	31,00
CHX (C+)	8	14,75	14,00	1,83	13,00	18,00

*C-: Agua destilada (AD) *C+: Clorhexidina (CHX) al 0,12 % *n: Tamaño muestral *D.E.: Desviación estándar
*Min.: Valor mínimo *Max.: Valor máximo

DISCUSIÓN

La infusión de *Origanum vulgare* difunde fácilmente en agar. Los hallazgos de este estudio señalan las infusiones a partir del 20 % de concentración son efectivas respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans*, como señala Albado Plaus *et al.* el orégano posee actividad antimicrobiana sobre bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, y gram negativas como la *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae*; siendo *Streptococcus mutans* una bacteria gram positiva y de gran importancia en el desarrollo inicial de la caries dental (Negroni, 2009). Este efecto antibacteriano puede ser debido a que como señala Amadio *et al.* el *Origanum vulgare* posee un alto contenido en compuestos polifenólicos.

Se ha demostrado la actividad antimicrobiana presente en los componentes principales del orégano, carvacrol y timol (fenoles). Ambos compuestos afectan la permeabilidad de la membrana célula (Ramírez *et al.*, 2009). Posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

Se evidencia que el efecto antibacteriano del orégano es directamente proporcional a la concentración de la dilución. Lo que explica que a mayor concentración mayor efecto antibacteriano.

El aporte de esta investigación señala que el orégano tiene efecto sobre el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* por lo que sería una excelente alternativa para disminuir el crecimiento de esta bacteria y por ello la aparición de caries.

El orégano es una excelente alternativa por ser económico y natural. Además existen diferentes métodos de utilizarlo en fitoterapia tales como infusiones, vahos, cataplasmas, esencias (Zin & Weiss, 2001); y posee otros usos terapéuticos beneficiosos para el organismo como ser expectorante, antifúngico, antiinflamatorio, entre muchos otros (Hoffmann *et al.*).

En otras especies de orégano se han realizado estudios toxicológicos agudos, con extracto acuoso liofilizado de orégano francés y, demuestran que este no es tóxico por vía oral (Menéndez Castillo & Pavón

González, 1999). Por tanto si se utiliza el orégano a la dosis recomendada presenta muy poca toxicidad.

En el futuro se podría utilizar el orégano en colutorios, pastas dentales, y otros coadyuvantes de higiene oral.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio muestran que el *Origanum vulgare* a bajas concentraciones (1 %, 5 %, y 10 %) no presentan ningún efecto antibacteriano sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. Sin embargo a altas concentraciones (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %) presentan efecto antibacteriano frente al crecimiento de *Streptococcus mutans*. Por lo que se determinó que el mínimo efecto inhibitorio se logró al 20 % que corresponde a 4 g de orégano en 200 ml de agua.

Según la Figura 3, a mayor concentración de la dilución de orégano se obtuvo como resultado mayores halos de inhibición promedio a partir de la infusión al 20 %. Siendo el diámetro del halo promedio de las infusiones de 40 %, 60 %, 80 % y 100 % mayor al de la clorhexidina.

Pese a que no se han realizado estudios de toxicidad en boca el orégano sería un coadyuvante en la higiene oral, al ser económico, fácil de conseguir en el mercado y de preparar. Por ser un producto natural sería una excelente alternativa para emplearlo en un futuro como colutorio u otro elemento coadyuvante de higiene oral.

Luego de este estudio experimental podemos determinar que el orégano (*Origanum vulgare*) tiene efecto antibacteriano sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*.

SCHOVELIN, H. A. & MUÑOZ, C. M. Antibacterial effect of oregano infusion (*Origanum vulgare*) on *in vitro* growth of *Streptococcus mutans*, 2015. *Int. J. Odontostomat.*, 12(4):337-342, 2018.

ABSTRACT: *Streptococcus mutans* is one of the main bacteria in the development of dental caries, a disease with high prevalence in the world population, and therefore a public health problem. There is current research to find prevention alternatives one of these is the use of medicinal plants for therapeutic purposes beneficial to health. To evaluate the

antibacterial effect of *Origanum vulgare* at different concentrations on *in vitro* growth of *Streptococcus mutans*, previously isolated bacterial strains of *Streptococcus mutans* were used. Bacterial seeding was carried out in 24 petri dishes with agar *Mitis salivarius*. Oregano infusions were prepared at 8 different concentrations (1 %, 5 % and 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % and 100 %) and applied in pre-drilled holes in the agar plates (4 perforations per plate for the oregano infusions and 2 for control plates). They were maintained in an incubator for 48 hours and measurement of the inhibition zones was subsequently carried out. The results were negative for infusions of oregano at 1 %, 5 % and 10 %, as they did not present halos of bacterial inhibition; while results were positive for infusions at 20 %, 40 %, 60 %, 80 % and 100 %. Results show that oregano has an antibacterial effect on the growth of *Streptococcus mutans* in infusion concentrations above 20 %, with the basic solution prepared from 20 g of dried oregano leaves (*Origanum vulgare*) and 200 ml of boiled distilled water. This antibacterial effect is directly proportional to the concentration of the infusion. Oregano could be used as an alternative mouthwash, toothpaste or other oral hygiene adjuvants to prevent the incidence of caries.

KEY WORDS: oregano (*Origanum vulgare*), antibacterial effect, *Streptococcus mutans*, caries.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albado Plaus, E.; Saez Flores, G. & Grabiell Ataucasi, S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev. Med. Hered.*, 12(1):16-9, 2001.
- Amadio, C.; Medina, R.; Dediol, C.; Zimmermann, M. E. & Miralles, S. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Rev. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. Cuyo*, 43(1):237-45, 2011.
- Arcila-Lozano, C. C.; Loarca-Piña, G.; Lecona-Urbe, S. & González de Mejía, E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 54(1):100-11, 2004.
- Avello, L. M. & Cisternas, F. I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Med. Chile*, 138(10):1288-93, 2010.
- Bascones, A. & Morante, S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Av. Periodoncia Implantol. Oral*, 18(1):21-9, 2006.
- Fonnegra, G. R. & Jiménez, R. S. L. *Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia*. 2° ed. Medellín, Editorial Universidad de Antioquia, 2007.
- Gispert Abreu, E.; Rivero López, A. & Cantillo Estrada, E. Relación entre el grado de infección por *Streptococcus mutans* y la posterior actividad cariogénica. *Rev. Cuba. Estomatol.*, 37(3):157-61, 2000.
- Hoffmann, A.; Farga, C.; Lastra, J. & Veghazi, E. *Plantas Medicinales de Uso Común en Chile*. 2° ed. Santiago de Chile, Fundación Claudio Gay, 1992.
- Kaurinovic, B. & Popovic M. *Liposomes as a Tool to Study Lipid Peroxidation*. In: Catala, A. (Ed.). *Lipid Peroxidation*. London, InTech, 2012. pp.155-80.

- Menéndez Castillo, R. A. & Pavón González, V. *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev. Cuba. Plantas Med.*, 4(3):110-5, 1999.
- Ministerio de Salud (MINSAL). Análisis de Situación de Salud Bucal. Santiago de Chile, Ministerio de Salud, 2007. Disponible en: <https://www.web.minsal.cl/portal/url/item/9c81093d17385cafe04001011e017763.pdf>
- Negróni, M. *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica*. 2ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Médica Panamericana, 2009.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Salud Bucodental. Nota Informativa N°318*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
- Ramírez, L. S.; Isaza, J. H.; Veloza, L. A.; Stashenko, E. & Marín, D. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. *Ciencia*, 17(4):313-21, 2009.
- Zin, J. & Weiss, C. *La Salud por Medio de Plantas Medicinales*. 8ª ed. Santiago de Chile, Don Bosco, 2001.

Dirección para correspondencia:
Alexandra Schovelin Herrera
Cirujano Dentista
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad del Desarrollo
Concepción
CHILE

Email: aleschovelin@hotmail.com

Recibido : 17-03-2018
Aceptado : 06-08-2018