

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO  
ESCUELA DE POSTGRADO  
SECCIÓN DE CIENCIAS MÉDICAS**



**SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DEL *Streptococcus mutans* ATCC  
2652263 FRENTE A TRES EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
*Camellia sinensis* "TÉ VERDE"**

**T E S I S**

**PARA OPTAR EL GRADO DE:  
MAGISTER EN ESTOMATOLOGÍA**

**AUTOR:  
TERESA VERÓNICA ULLOA CUEVA**

**ASESOR:  
DR. MARCO ANTONIO REÁTEGUI NAVARRO**

**TRUJILLO-PERU  
2009**

# ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	09
3. RESULTADOS .....	19
4. DISCUSIÓN .....	24
5. CONCLUSIONES .....	27
6. RECOMENDACIONES .....	28
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS	

## DEDICATORIA

A Dios, por sus bendiciones e inmenso amor, que guía cada etapa de mi vida.

A mis padres **Rámel y Teresita**, porque con su gran amor, dedicación y ejemplo, me inculcaron la perseverancia en el logro de mis metas.

A mis hermanos, Toño, Deli, Paola y Karla, por su cariño, ejemplo y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Antonio Reátegui Navarro, por la guía y asesoramiento brindados en la realización del presente trabajo de investigación.

A la Mg. Elva Mejía Delgado, por su valiosa colaboración en la ejecución del presente trabajo.

Al Dr. Enrique Martin Alva, por su amistad y apoyo constante en la elaboración y desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Alfredo Martin Alva, por su asesoramiento y orientación en la elaboración del presente informe de investigación.

A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional en el logro de mis metas y en mi formación personal y profesional.

## RESUMEN

El *Streptococcus mutans* es el principal agente causal de la caries dental; y ante la ausencia de una sustancia que lo inhiba sin producir efectos colaterales, se realiza el presente estudio, de tipo experimental; con el objetivo de conocer la susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”.

Se midió la susceptibilidad del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”: al 5%, 10% y 20% sin diluir; así como diluciones de 75%, 50% y 25% de cada uno de los extractos, obteniendo así, 12 subgrupos experimentales y uno control correspondiente al etanol q.p.; utilizando el método de Difusión en discos de papel.

Los resultados muestran formación de halos de inhibición en los tres extractos etanólicos, con sus respectivas diluciones; siendo el valor más alto el que corresponde a los extractos al 100%; es decir, sin diluir; y, siendo mayor en el extracto de 20%. Lo cual nos hace concluir que el *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es susceptible a los extractos etanólicos de 5%, 10% y 20% de *Camellia Sinensis* “té verde” y que la susceptibilidad aumenta a medida que la concentración de los extractos etanólicos y sus respectivas diluciones van en aumento.

Palabras claves: Susceptibilidad, *Streptococcus mutans*, extracto etanólico de *Camellia sinensis* “té verde”.

## ABSTRACT

*Streptococcus mutans* is the principal causative agent of dental caries, and the absence of a substance that inhibits it without producing side effects, is the reason for doing the present study, which is experimental type. This study has the objective to determine in vitro the susceptibility of *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 against three ethanolic extracts of *Camellia sinensis* "green tea".

We measured the susceptibility of *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 against three ethanolic extracts of *Camellia sinensis* "green tea": 5%, 10% and 20% undiluted, as well as dilution of 75%, 50% and 25% of each one of the extract; using the paper disk diffusion method. There were twelve experimental subgroups and one control group (ethanol q.p).

The results show growth inhibitory zone in the three ethanolic extracts and their respective dilutions, being the highest average corresponding to the extracts at 100%, undiluted, and the highest one was the extract of 20%. Which makes us conclude that *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 is susceptible to ethanolic extracts of 5%, 10% and 20% of *Camellia Sinensis* "green tea" and that the susceptibility increases as the concentration of the ethanolic extracts and their respective dilutions are increasing.

Keywords: Susceptibility, *Streptococcus mutans*, ethanol extract of *Camellia sinensis* "green tea".

## 1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad del sistema estomatognático con mayor prevalencia en la población mundial, por lo que constituye uno de los mayores problemas de salud pública.<sup>1-3</sup> La caries es una entidad patológica, infecciosa, crónica, progresiva y transmisible, de origen multifactorial, que es producida por la acción de microorganismos de la placa bacteriana; los cuales por su metabolismo producen ácido, especialmente por la fermentación de hidratos de carbono, originando la desmineralización gradual del esmalte seguida de la destrucción proteolítica rápida de la estructura dental, hasta llegar a la pérdida total del diente.<sup>1,2,4</sup>

Los principales microorganismos de la placa bacteriana implicados en el inicio y desarrollo de la caries son: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.* y *Actinomyces sp.*<sup>5-8</sup> Desde los estudios de Clark en 1924 hasta la fecha, diversas investigaciones han asociado al *S. mutans* con la formación de caries dental,<sup>6,7,9-12</sup> de tal manera que en la actualidad dicho microorganismo se considera como uno de los principales factores causales de la enfermedad en el humano.<sup>5-15</sup>

El *S. mutans* presenta diferentes características que son determinantes en su cariogenicidad, entre éstas tenemos: la producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, en especial los glucanos insolubles

que son muy importantes en la colonización y mantenimiento de esta bacteria sobre el diente; posee elementos que determinan fenómenos de adhesión, agregación y congregación; la producción y metabolización de polisacáridos intracelulares, lo que le permite obtener energía y producir ácido durante largos periodos de tiempo; rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos; poder acidógeno, acidófilo y acidúrico; así como también puede conseguir un pH crítico para la desmineralización del esmalte más rápidamente que otro microorganismo de la placa.<sup>5,6,8,13,14</sup>

Algunos estudios establecen que el control de la infección cariogénica y consecuentemente, el control de la caries, pueden ser hechos a través de: la interrupción de la transmisión del *Streptococcus mutans*, de su eliminación o reducción y de la protección de las personas susceptibles, con la implementación del control dietético y el uso de sustancias antimicrobianas.<sup>13,14</sup>

En este enfoque se ha probado el uso de antibióticos: bacitricina, eritromicina, lincomicina, penicilina, espiramicina, tetraciclina, vancomicina, entre otros, mostrando enormes desventajas en este tipo de recurso, como los predecibles efectos de producción de cepas resistentes, de alteraciones ecológicas en la población bacteriana que resultan en daño para el huésped, candidiasis, reacciones laterales, alergia, etc.<sup>14</sup>



Aún así, se investiga el uso de sustancias con propiedades antibacterianas específicas para placa bacteriana, que no compitan con aquellos comúnmente utilizados en la terapéutica general.<sup>14</sup> Entre los más utilizados, en forma de enjuagatorios y geles, tenemos al gluconato de clorhexidina, sanguinaria, triclosan, hexitidina, cloruro de cetilpiridino, compuesto fenólico, etc. Dentro de los cuales; en diversos estudios, el gluconato de clorhexidina presenta mejores resultados en su capacidad de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*.<sup>15-17</sup>

Sin embargo, el gluconato de clorhexidina presenta el inconveniente de producir efectos tóxicos locales como: tinción de dientes y obturaciones, pigmentación del dorso de la lengua y con menor frecuencia, descamación de la mucosa bucal, gusto amargo o modificación gustativa, sensación de quemadura, sequedad bucal e inflamación ocasional y transitoria de la parótida.<sup>14, 18,19</sup>

En este sentido, el advenimiento de la fitoterapia o terapia empírica con plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, tanto orgánicas, nutricionales e infecciosas, ha planteado la necesidad de estudiarlas en el marco del rigor científico. En varias plantas se han visto empíricamente y determinado metodológicamente principios activos de naturaleza antimicrobiana diversa.<sup>20</sup> Una de tales plantas es *Camellia sinensis* “té verde” que ha demostrado efectos sobre una serie de microorganismos.<sup>21-27</sup>

El “té verde” proviene de la planta *Camellia sinensis*, de la que se extraen, también otros tipos de té (negro, rojo y blanco), dependiendo de su proceso de elaboración.<sup>28</sup> *C. sinensis* o *Thea sinensis*, de la familia Teáceas o Cameliáceas, es un árbol originario del sudeste asiático, actualmente cultivado en países tropicales de África y América. Puede alcanzar hasta 10 ó 15 metros de altura en estado salvaje, aunque se suele talar a 1-2 metros del suelo para facilitar su recolección.<sup>29,30</sup>

Esta planta posee hojas perennes, elípticas; flores blancas, olorosas y fruto capsular con tres semillas negruzcas.<sup>28,31</sup> La parte de la planta empleada con fines terapéuticos son las hojas; las cuales son lanceoladas y agudas, de color verde oscuro y dentadas en sus 2/3 superiores. Se disponen alternas y miden generalmente entre 5-10 cm de largo por 2-4 cm de ancho.<sup>30</sup>

El té verde se elabora por recolección de la hoja, la cual se deja secar y seguidamente se le aplica un tratamiento térmico (cocción al vapor y secado al fuego) para detener la fermentación de las enzimas y así evitar su descomposición. De esta forma, a diferencia de lo que ocurre con el té negro y rojo, en el té verde se detiene el proceso de fermentación, las enzimas oxidantes permanecen inactivas y su contenido en polifenoles queda intacto.<sup>29,30</sup>

Las hojas de té contienen más de 350 constituyentes, de los cuales, 5-6% son de agua, 40% hidratos de carbono, el 20% proteínas, el 2% lípidos y el

9% minerales (manganeso, potasio, magnesio, flúor) además de vitaminas, como la Vit. B (B1,B2,B3) o la vitamina C en el té verde.<sup>28-32</sup> Así mismo, posee alcaloides (2-4%), derivados de la purina, conocidos más comúnmente como bases xánticas; de las cuales, las más abundantes son la cafeína (4%), teofilina y teobromina. También contiene una pequeña cantidad de aceite esencial (0.007-0.014%) en las hojas frescas.<sup>28-32</sup>

Entre los principios activos responsables de la actividad terapéutica del té verde destacamos su contenido en compuestos polifenólicos (3%) que son de tres tipos: flavonoides o bioflavonoides (Vitamina P como: quercetol, kenferol, miricetol); catequinas (siendo la Epigallocatequina galato (EGCG) la más potente); y, taninos catéquicos condensados (8-25%).<sup>28-32</sup>

Gracias a su variada composición química, el “té verde” posee interesantes efectos terapéuticos. Diferentes estudios han comprobado que el té verde es anticancerígeno, siendo capaz de contrarrestar la aparición y desarrollo de diferentes tipos de cáncer. También, ayuda a frenar el envejecimiento y el avance de algunas enfermedades degenerativas. Actúa como estimulante del sistema nervioso; presenta acción diurética, broncodilatadora y astringente (antidiarréica).<sup>28-30</sup>

Además, el “té verde” es hipolipemiante; es decir, capaz de reducir los niveles de LDL-colesterol y de triglicéridos plasmáticos, a la vez que eleva los niveles de HDL-colesterol. Gracias a sus propiedades antioxidantes, evita la oxidación del colesterol y tiene un efecto antiarterosclerótico. Así

mismo, disminuye los niveles de azúcar en sangre; es decir, es hipoglucemiante; y tiene efectos de antibiosis frente a ciertas bacterias y algunos virus.<sup>28-30,32</sup>

Con respecto a las propiedades antimicrobianas, Toda y col. encontraron que los extractos de “té verde” eran capaces de inhibir y eliminar cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio Cholerae*.<sup>21-27</sup>

Estudios en el campo de estomatología fueron realizados por Abu y col., quienes determinaron la actividad del “té verde” contra especies de *Clostridium* y de *Pseudomonas*,<sup>25</sup> además, Funosas E. y col., demostraron la eficacia del té verde en la reversión de las variables clínicas en el tratamiento de la periodontitis crónica.<sup>26</sup> Así mismo, Okubo y col. concluyeron que *Candida albicans* no era sensible a la acción inhibitoria del “té verde”.<sup>27</sup>

En Inglaterra, Jones C y col., en un trabajo transversal con estudiantes de secundaria, demostraron que la bebida de “té verde” disminuye la caries dental.<sup>33</sup> En Perú, Moromi H. y Martínez E. estudiaron el efecto de la infusión del “té verde” al 10 % w/v en la formación de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*, demostrando una notaria disminución y falta de adherencia en la formación de la placa en el alambre de nichrome utilizado en el laboratorio.<sup>34</sup>

Debido a que la caries dental es una de las enfermedades orales con mayor prevalencia en todo el mundo; y, siendo el *Streptococcus mutans* considerado el principal microorganismo responsable del inicio de este proceso, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar la forma de eliminarlo o controlarlo, como la utilización de compuestos químicos que pueden actuar a nivel del crecimiento de esta bacteria; tales como componentes de pastas dentales, enjuagatorios bucales y soluciones tópicas.

El hecho es que aún no se ha encontrado un agente ideal que permita lograr estos objetivos sin causar efectos secundarios tanto a nivel local como sistémico. Es así, que se mantiene una permanente búsqueda de alternativas terapéuticas en la biodiversidad de plantas medicinales. Una de ellas es *Camellia sinensis* “té verde”, que utilizada en infusión ha demostrado efectos satisfactorios;<sup>33,34</sup> por tal razón, a través del presente estudio se busca confirmar si el *Streptococcus mutans* también es susceptible a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”; así como encontrar la concentración de extracto que produce mayor susceptibilidad; considerando que la utilización de un producto natural sería beneficioso para la salud oral sin producir efectos tóxicos.

## 1.1 Problema

¿Cuál es la susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”?

## 1.2 Hipótesis

El *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es susceptible a los tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde” y la susceptibilidad varía de acuerdo a la concentración del extracto.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo General

Determinar la susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 producido por tres extractos etanólicos al 5%, 10% y 20% de *Camellia sinensis* “té verde”.
- Determinar la susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 producido por tres diluciones a las concentraciones de 75%, 50% y 25% de cada extracto etanólico de *Camellia sinensis* “té verde”.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Tipo y Área de estudio

El presente trabajo, por ser una investigación aplicada y explicativa.

Se realizó en el Laboratorio de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo y en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

### 2.2 Definición de la Población Objetivo

Conjunto de repeticiones de cada una de las diluciones por extracto etanólico de *Camellia sinensis* "té verde", de los extractos al 100% y del etanol q.p., con siembras de *Streptococcus mutans* ATCC 2652263. Dicho universo tiende al infinito, y puede ser tan grande según la disponibilidad del investigador.

### 2.3 Criterios de Control y Balance

Fueron excluidos del estudio aquellos cultivos en los que se observó deficiencias en la manipulación.

### 2.4 Diseño Estadístico del Muestreo

#### Unidad de Análisis y de Muestreo

La Unidad de Análisis y de Muestreo lo constituyó cada repetición de las diluciones por extracto etanólico de *Camellia sinensis*, de los extractos al

100% y del etanol q.p., con siembras de *Streptococcus mutans* ATCC 2652263.

### Tamaño Muestral

La muestra estuvo constituida por 158 repeticiones, siendo ésta redondeada a **182** para obtener así, un igual número de repeticiones por subgrupo (14 repeticiones). Dichas repeticiones fueron colocadas en 26 placas petri, y se realizaron 7 repeticiones en cada una de ellas. El tamaño de la muestra fue calculada según la fórmula estadística siguiente:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \times S^2}{d^2} = \frac{(1.96)^2 \times (5.28)^2}{0.825} = 158$$

Donde:

Z= 1.96 (95% de confiabilidad)

S= 5.28

d= 0.825 (5% del promedio reportado de 16.5 Ø halo).<sup>20</sup>

### Método de Selección

La muestra estuvo constituida por 182 repeticiones, las cuales fueron divididas en los siguientes 4 grupos y 13 subgrupos:

- **GRUPO 1:** Extracto etanólico de *Camellia sinensis* al **5%** en etanol de 50°.

**Subgrupo 1-A:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando el extracto al 100%.



**Subgrupo 1-B:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 75% del extracto.

**Subgrupo 1-C:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 50% del extracto.

**Subgrupo 1-D:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 25% del extracto.

- **GRUPO 2:** Extracto etanólico de *Camellia sinensis* al **10%** en etanol de 50°.

**Subgrupo 2-A:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando el extracto al 100%.

**Subgrupo 2-B:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 75% del extracto.

**Subgrupo 2-C:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 50% del extracto.

**Subgrupo 2-D:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 25% del extracto.

- **GRUPO 3:** Extracto etanólico de *Camellia sinensis* al **20%** en etanol de 50°.

**Subgrupo 3-A:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando el extracto al 100%.

**Subgrupo 3-B:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 75% del extracto.

**Subgrupo 3-C:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 50% del extracto.

**Subgrupo 3-D:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando una dilución al 25% del extracto.

- **GRUPO 4: Control**

**Subgrupo 4-A:** 14 repeticiones en dos placas petri (7 repeticiones en cada una) con siembra de *Streptococcus mutans*, utilizando Etanol q.p.

## 2.5 Procedimientos de Laboratorio

### A) Obtención de la hoja de *Camellia sinensis* “té verde”

Las hojas de *Camellia sinensis* “té verde” fueron obtenidas de la Distribuidora e Importadora XIN XING S.A. (Lima – Perú).

## **B) Preparación de los extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”**

La preparación del extracto etanólico de *Camellia sinensis* “té verde” se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Se prepararon los extractos etanólicos de las hojas *Camellia sinensis* “té verde” al **5%, 10% y 20%**, utilizando etanol de 50°, siguiendo el mismo procedimiento para los tres extractos:

- Se pesó 5g, 10g y 20g de hoja triturada de *Camellia sinensis* “té verde” previamente secado en la estufa a 40°C.
- La droga pesada se colocó en un matraz de 250 mL de capacidad.
- Se humectó con etanol de 50° con el doble de peso de la droga.
- Luego, se vierte 100 mL de etanol de 50° a la droga humectada.
- Se tapó y se rotuló, dejando en maceración por 14 días, con agitación cada 4 horas.
- Pasado los 14 días, se filtró utilizando una bomba al vacío.
- El filtrado se dejó reposar en refrigeración por 8 días, observando que no haya precipitado.
- Se envasaron los tres extractos en frascos de color ámbar estéril, y se rotularon (fecha, % de droga y grado alcohólico).<sup>35,36</sup>

## **C) Obtención de la cepa**

El *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 fue obtenido del cepario del Laboratorio de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

#### D) Preparación de la cepa

Una vez obtenida la cepa, ésta fue cultivada en tubos de ensayo con tapa rosca conteniendo el medio Soya tripticasa, incubándose a 37 °C con el fin de obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas de cultivadas se les agregó solución salina estéril, hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 1 de la escala de Mac Farland.

Los tubos que contenían la bacteria estudiada, fueron girados entre las manos durante 30 segundos, antes de proceder al sembrado, para distribuir los microorganismos adecuadamente.<sup>37-39</sup>

#### E) Sembrado

Se embebió un hisopo estéril con la cepa preparada de *Streptococcus mutans* y a una distancia de 10 cm de la llama del mechero, se realizó el sembrado en placas petri, conteniendo Agar Sangre, hisopando uniformemente sobre toda la superficie del agar y girando cada placa 30 grados por 10 veces aproximadamente. Las placas recién sembradas fueron colocadas dentro de una estufa a 37 °C de temperatura durante 10 minutos.<sup>37-39</sup>

#### F) Prueba de Susceptibilidad

- Para la prueba de susceptibilidad, se prepararon 3 diluciones al 75%, 50% y 25% de cada uno de los tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”, utilizando etanol q.p. como diluyente; obteniendo así, un total de 9 diluciones. Dichas diluciones, los tres

extractos al 100% y el etanol q.p. se conservaron a 4 °C para el estudio bacteriológico.

- Se utilizó el método de Difusión en Discos. Se prepararon discos de papel de filtro estériles de una medida de 5 mm de diámetro, los cuales fueron sumergidos dentro de cada dilución de los extractos de *Camellia sinensis* “té verde”, luego con una aguja estéril éstos fueron colocados sobre los cultivos de *Streptococcus mutans* en placas petri previamente preparados. De la misma forma se procedió con los extractos al 100% y en las placas destinadas al grupo control se utilizó Etanol q.p.
- Posteriormente las placas se incubaron a 37°C en microaerobiosis utilizando la Jarra Gas-Pack (con el método de la vela, mediante el cual se obtuvo un ambiente aproximado de 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>). Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm. de la llama de un mechero.
- La lectura se realizó a las 24 horas. Se midieron los halos de susceptibilidad o de inhibición de cada dilución de los extractos, incluyendo el área del disco de papel de filtro, con un Vernier (marca Mitutoyo), procediéndose de igual manera con los extractos al 100% y el etanol q.p.<sup>37-39</sup>
- A esta medida se le restó la medida del diámetro del disco (5 mm); datos que fueron registrados en la ficha elaborada para este estudio.

## 2.6 Registro de Información

### - Instrumento para la medición de los halos

Vernier (marca Mitutoyo)

### - Ficha de Recolección de Datos

La información recolectada sobre los halos de inhibición, se registraron en una ficha confeccionada especialmente para el presente trabajo. (Anexo N° 1).

## 2.7 Operacionalización de Variables

### a) Extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”

#### Definición Conceptual:

Son soluciones obtenidas de las hojas de *Camellia sinensis* “té verde” trituradas, luego humectadas, maceradas y filtradas, utilizando etanol a 50°. <sup>35,36</sup>

#### Definición Operacional:

Extractos etanólicos al 5%, 10% y 20% de *Camellia sinensis* “té verde” en etanol a 50° P/V; y cada uno de ellos, diluidos en concentraciones de: 75%, 50% y 25% respectivamente.

## b) Susceptibilidad in vitro de *Streptococcus mutans* ATCC 2652263

### Definición Conceptual:

Sensibilidad o Resistencia del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 bajo la acción de las diferentes diluciones de los extractos etanólicos de *Camellia sinensis* "té verde".<sup>37-39</sup>

### Definición Operacional:

Corresponde a la medida del diámetro del halo de susceptibilidad o inhibición de crecimiento bacteriano en las placas petri con siembra de este microorganismo, el cual fue medido en milímetros, con un Vernier (marca Mitutoyo) a las 24 horas. A esta medida obtenida se le restó la medida del diámetro del disco de papel (5 mm).

## 2.8 Análisis Estadístico e Interpretación de la información

El modelo que se utilizará es el de Efectos Fijos.

**Modelo:**  $y_i = \mu + \alpha_i + B_i + (C \cdot D)_i + e$

Donde:

$\mu$ : media general

$\alpha_i$ : efecto del extracto (3 niveles)

$B_i$ : efecto de la dilución (4 niveles)

$(C \cdot D)_i$ : efecto de interacción C-D (12 niveles)

$e$ : componente de error

Se aplicó el test de comparación múltiple de medias a través del ANOVA en una vía, con la aplicación previa del test de homogeneidad de varianzas.

Se consideró un error del 5 %.

Se aplicó el test de Tukey para la comparación de las distintas combinaciones de concentraciones 2 a 2.<sup>40,41</sup>

Adicionalmente se aplicó un Test de Regresión Lineal Simple entre la concentración real del extracto y el halo promedio como indicador de susceptibilidad.

BIBLIOTECA DIGITAL DE POSGRADO



### 3. RESULTADOS

En el presente estudio se ha evaluado la susceptibilidad in vitro de la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus mutans* frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”; a través de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano; lo cuales se observaron como una zona rojo-brillante rodeando a los discos de papel filtro ( $\varnothing = 5.00$  mm), diferenciándolos del resto de la placa que tenía color rojo-vino-opaco, que evidencia el crecimiento bacteriano.

En la Tabla N° 1 se presentan los valores de medias y desviación estándar del halo de inhibición y de crecimiento de *Streptococcus mutans*, para las concentraciones de los extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde” al 5%, 10% y 20%, así como los promedios para las diluciones de 25%, 50%, 75% de cada extracto; para los extractos al 100% y para el etanol q.p, como control. Los resultados, parecen indicar que, en todos los casos, el valor más alto del halo corresponde a los extractos al 100%; siendo mayor en el extracto de 20%.

Por otro lado, los valores de la desviación estándar, indican acentuada dispersión de los datos para el extracto de 20% y extracto al 100%.

El Análisis de Varianza (ANOVA) indica que tanto en la concentración del extracto, la dilución; así como en la interacción de ambos, existen diferencias altamente significativas; es decir que, en cada caso, por lo menos uno de los niveles difiere de los demás. (Tabla N° 2)

TABLA Nº 1

**MEDIDAS DESCRIPTIVAS DE PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR DEL HALO DE INHIBICIÓN COMO INDICADOR DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 FRENTE A TRES EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Camellia sinensis* “té verde”**

EXTRACTO %	DILUCIÓN %	CONCENTRACIÓN PROMEDIO		D.E. HALO
		REAL	HALO	
0	0	0.00	0,0000	0,0000
5	25	1.25	3,9286	2,2690
	50	2.50	3,4286	2,5333
	75	3.75	4,1429	2,1070
	100 puro	5.00	4,9286	1,6854
10	25	2.50	1,0000	0,0000
	50	5.00	1,2143	0,4258
	75	7.50	2,7857	1,5281
	100	10.00	3,5000	2,3122
20	25	5.00	0,0000	0,0000
	50	10.00	2,9286	1,2688
	75	15.00	2,6429	1,5984
	100	20.00	8,6429	4,4654
TODAS	0	0.00	0,0000	0,0000
	25	8.75	1,6429	2,1164
	50	17.50	2,5238	1,8772
	75	26.25	3,1905	1,8510
	100	35.00	5,6905	3,7056

TABLA Nº 2

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMPARADO MEDIANTE ANOVA DEL DEL HALO DE INHIBICIÓN COMO INDICADOR DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 FRENTE A TRES EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Camellia sinensis* “té verde”**

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO	RAZÓN F	SIFN ESTAD
EXTRACTO	58,577	14,99	p < 0.01
DILUCIÓN	126,968	32,48	p < 0.01
EXTRACTO Y DILUCIÓN	42,308	10,82	p < 0.01
ERROR	3,909		

TABLA N° 3

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMPARADO POR CONCENTRACION DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Camellia sinensis* “té verde” CON HALO DE INHIBICIÓN PROMEDIO COMO INDICADOR DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 2652263**

EXTRACTO (%)	PROMEDIO	DESV ESTANDAR	NUMERO OBSERVACIONES	AGRUPACIONES
0	0,000	0,000	14	X
10	3,5000	2,3122	14	X
5	4,9286	1,6854	14	X
20	8,6429	4,4654	14	X

Probabilidad de Error:  $\alpha/2 = 0.05$

La Tabla N° 3 indica que el extracto etanólico de *Camellia sinensis* “té verde” al 5 % es igual al de 10%, pero no al de 20%. Así mismo, en el cuadro N° 4, se demuestra estadísticamente con un nivel de significancia del 5%, que a una dilución de 50 % del extracto, el halo promedio es igual al halo obtenido con dilución de 75% del extracto, pero difiere del halo cuando se emplea extracto puro (100%), cuyo halo es mayor.

Es decir, se confirma que la concentración del extracto influye en el halo de inhibición promedio como indicador de susceptibilidad de *Streptococcus mutans* ATCC 2652263.

En resumen, se puede afirmar que el valor del halo varía gradualmente al variar la concentración del extracto. Lo cual se confirma con el ANOVA para la regresión entre concentración real del extracto (TABLA N° 5 y GRÁFICA N° 1).

TABLA N° 4

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMPARADO POR NIVEL DE DILUCIÓN CON HALO DE INHIBICIÓN PROMEDIO COMO INDICADOR DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 FRENTE A TRES EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Camellia sinensis* “té verde”**

DILUCIÓN	PROMEDIO	DESV ESTANDAR	NUMERO OBSERVACIONES	AGRUPACIONES
0.00 de extracto	0,000	0,000	14	X
25 % de extracto	1,6429	2,1164	52	X
50 % de extracto	2,5238	1,8772	52	X
75 % de extracto	3,1905	1,8510	52	X
100 % de extracto	5,6905	3,7056	52	X

Probabilidad de Error:  $\alpha/2 = 0.05$

TABLA N° 5

**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA REGRESIÓN LINEAL SIMPLE ENTRE CONCENTRACIÓN REAL DEL EXTRACTO Y HALO DE INHIBICIÓN PROMEDIO COMO INDICADOR DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 FRENTE A TRES EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Camellia sinensis* “té verde”**

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZÓN $F_c$	PROBABILIDAD
REGRESIÓN LINEAL SIMPLE	23.5250	1	23.5250	7.0567	$P < 0.05$
ERROR	40.0047	12	3.3337		
TOTAL	63.5297	13			

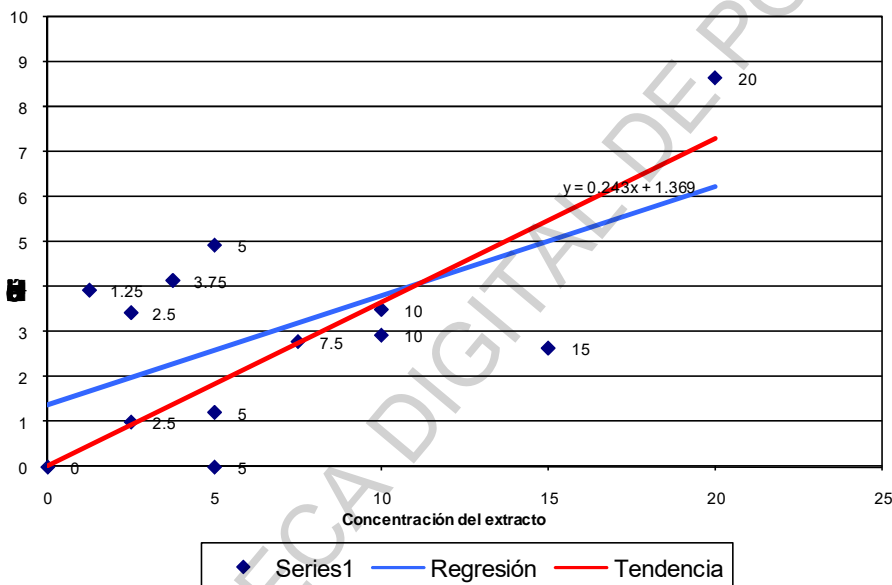
El valor de “ $F_c$ ” indica que estadísticamente, a un nivel de significancia del 5 %, existe regresión entre concentración real del extracto y halo de inhibición promedio, como indicador de susceptibilidad de *Streptococcus mutans* ATCC

2652263. Es decir que, la variación en la concentración del extracto afecta a la susceptibilidad de la bacteria (GRAFICA N° 1).

Además, el coeficiente de determinación ( $R^2 = 0.3703$ ), señala que el 37.03 % de la relación queda explicada por la regresión lineal simple, motivándose el resto a otras causas, incluyendo los errores sistemáticos.

### GRAFICA N° 1

Regresión de concentración del extracto VS halo de inhibición como indicador de susceptibilidad de *Streptococcus mutans* ATCC 2652263



#### 4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se ha evaluado la susceptibilidad in vitro de la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus mutans* frente a extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde”; habiendo encontrado resultados favorables, manifestados a través de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano. Lo cual demuestra que *Camellia sinensis* “té verde” tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 y que sólo requiere determinar la concentración de extracto más apropiado.

Estos resultados confirman lo encontrado por otros autores; como lo demostrado por Jones C y col., quienes afirman que *Camellia sinensis* “té verde” utilizado como infusión, tiene un impacto beneficioso contra la caries dental, debido al fluoruro natural que contiene; además, inhibe el crecimiento de bacterias orales como *E. coli*, *S. salivarius* y *S. mutans*.<sup>33</sup>

Así mismo, los resultados de este estudio confirman lo obtenido por Moromi H. y Martínez E., quienes afirman que los cultivos de *Streptococcus mutans* sin adición de té verde mostraron formación de placa bacteriana adherida fuertemente en el alambre utilizado en laboratorio; en tanto que los cultivos con adición de infusión de té verde mostraron muy poca formación de placa, y los residuos formados tenían muy poca adherencia, con desprendimiento rápido. Por lo tanto, se puede asumir que los polifenoles del “té verde” parecen inhibir la adherencia bacteriana a las superficies del diente, reduciendo la hidrofobicidad y el índice de producción de ácido; con lo que inhibe la cariogenicidad del *Streptococcus mutans*.<sup>34,42</sup>

Los promedios de halo de inhibición del crecimiento bacteriano del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 obtenidos en el presente trabajo, mostraron un aumento creciente a medida que la concentración del extracto etanólico de *Camellia sinensis* “té verde” va en aumento. (TABLA N° 1). Estos resultados, demuestran que *Camellia sinensis* “té verde”, además de tener acción antibacteriana, tiene directa relación con la concentración del extracto; es decir, que a mayor concentración del extracto se tiene mayor efecto antibacteriano; considerando que en el presente trabajo se utilizó el “té verde” en diferentes concentraciones, lo cual no se realizó en los trabajos referidos. (TABLAS N° 2, 3, 4, 5 y GRÁFICA N° 1).

Se demuestra, también, que el halo de inhibición, como indicador de susceptibilidad de *Streptococcus mutans*, está influenciado por la concentración del extracto; así como, por la dilución de los mismos y la interacción de extractos y dilución. Lo cual demuestra que la concentración del extracto influye en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans*; siendo más eficiente el extracto del 20 % y sin diluir (TABLAS N° 3 y 4). En cambio, los extractos de 5% y de 10 % (TABLA N° 3); así como las diluciones de 50 % y 75 % (TABLA N° 4), estadísticamente indican que no existe diferencias en la inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Estos resultados podrían deberse a diversas causas, como por ejemplo, la mutación de la cepa de *Streptococcus mutans* a nuevas formas fisiológicas<sup>38</sup>, con lo cual puede volverse resistente a la acción antimicrobiana del “té verde”; así como, al poco efecto de inhibición de crecimiento de la población por acción del “té verde”; efecto que al ser medido, a través del halo de inhibición, la técnica de

medición no pone de relieve las diferencias; y, además, puede deberse a errores sistemáticos, o a variables intervinientes o la interacción de todos ellos. Lo cual es preciso dilucidar más adelante, mediante un trabajo más específico, orientado a tal finalidad.

Además, se observó la ausencia de halo de inhibición en la concentración real 0,0 mg/ml de *Camellia sinensis* “té verde” (grupo control), donde se usó el diluyente etanol q.p. Esta “ausencia de efecto” (aparente inocuidad) del etanol sobre la cepa en estudio, se puede explicar por la rápida volatilidad de esta sustancia, así como por la resistencia del *Streptococcus mutans* ante la misma; como consecuencia de la capacidad mutagénica de la bacteria, que rápidamente puede producir formas alcohol-resistentes.<sup>38</sup>



## 5. CONCLUSIONES

1. El *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es susceptible a los tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* "té verde": 5%, 10% y 20%, y la susceptibilidad aumenta a medida a que la concentración de los extractos etanólicos y sus respectivas diluciones van en aumento.
2. El *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es susceptible a las tres diluciones en las concentraciones de 75%, 50% y 25% de cada extracto etanólico de *Camellia sinensis* "té verde".
3. El extracto al 20% de *Camellia sinensis* "té verde", sin diluir, es decir al 100% puro, produce mayor susceptibilidad al *Streptococcus mutans* ATCC 2652263.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Realizar una investigación orientada a determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de *Camellia sinensis* “té verde” en *Streptococcus mutans*, utilizando el método de diluciones en tubos.
2. Realizar estudios similares controlando la mutación de las cepas de *Streptococcus mutans* para evitar la resistencia a la acción inhibitoria del “té verde”.
3. Realizar estudios de susceptibilidad del *Streptococcus mutans* frente a los polifenoles extraídos del “té verde”, considerando la acción antibacteriana de éstos.
4. Realizar estudios de susceptibilidad con otros productos naturales cuyas propiedades puedan inhibir el crecimiento del *Streptococcus mutans*.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Joaquin F, Canseco J. Caries dental. La enfermedad oculta. Bol Med Hosp Infant Mex 2001; 58(10): 673-6.
2. Albala C, Vío del R. Transición Nutricional en Chile. Rev Chil Nut 1998; 25(3):24-8.
3. Stephen KW. Caries in young populations worldwide. In: Bowen WH & Tabak, editors. Cariology for the nineties. New York: University of Rochester Press; 1993. p. 37-50.
4. Palomer L. Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. Rev Chil Pediatr [serie en línea] 2006 [citado 31 Octubre 2006]; 77(1): 56-60: [2456]  
Disponibile en: URL:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-41062006000100009&Ing=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062006000100009&Ing=es&nrm=iso).
5. Liébana UJ. Microbiología Oral. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1995.
6. Linossier A, Gajardo M, Olavarría J. Paleomicrobiological study in dental calculus: Streptococcus mutans. Scann Micros 1996; 10: 1005-114.
7. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev 1986; 50: 353-80.
8. Tanzer J, Livingston J, Thompson A. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001; 65: 1028-37.
9. Vaananen MK, Markkanen MA, Tuovivien VJ, Kulla AM, Karinpaa AM, Luomalt EA, et al. Dental caries and mutans streptococci in relation to plasma ascorbic acid. Scand J Dent Res 1994; 102(2): 103-8.

10. O'Sullivan DM, Thibodean EA. Caries experience and mutans Streptococci as indicators of caries incidence. *Pediatr Dent* 1996; 18(5): 371-4.
11. Gregory RL, Rahamanam, Avery DR. Effect at restorative treatment on mutans streptococci and IgA antibodies. *Pediatr Dent* 1998; 20(4): 273-7.
12. Shi W, Jewett A, Nume WR. Rapid and quantitative detection of streptococcus mutans with species specific monoclonal antibodies. *Hybridoma* 1998; 17(4): 365-71.
13. Weyne S. *Operatoria Dental de Baratieri Luis*. 2ª ed. Sao Paulo: Quintessence, 1991.
14. Escobar F. *Odontología Pediátrica*. 1ª ed. Caracas: Amolca; 2004.
15. Camejo M. Sensibilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* a Sanguinaria, Compuesto fenólico y Clorhexidina. *Acta Odontol Venez* 1999; 37(2): 33-7.
16. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, O'Connor A, Sanz-Alonso M. Actividad antimicrobiana en saliva de cuatro colutorios con clorhexidina. *Periodoncia (Barc)* 2001; 11: 193-202.
17. Løe H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J* 2000; 50: 129-39.
18. Albertos JM, Junquera LM, Albertos MT, Olay S, López-Arranz E. La clorhexidina. Perspectiva actual. *An Odontoestomatol* 1996; 5: 217-24.
19. Van Rijkom H, Truen G, Van't Hof M. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidina treatment. *J Dent Res* 1996; 75: 790-5.
20. Díaz K, Moromi H. Determinación antibacteriana *in vitro* de *Mentostachys mollis* (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. *Odontol Sanmarquina* 2005; 8(2): 3-5.

21. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Sukuki Y, Hara Y, Shinamura T. The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio Cholerae*. *J Microbiol Immunol* 1992; 36: 999-1001.
22. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shinamura T. The bactericidal activities of tea and coffee. *Lett Appl Microbiol* 1989; 8:123-5.
23. Toda M, Okubo S, Ohnishi R, Shinamura T. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn J Bacteriol* 1989; 44: 669-72.
24. Toda M, Okubo S, Hara Y, Shinamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn J Bacteriol* 1991; 46:839-45
25. Abu Y, Sakanaka S, Kim M, Kawamura T, Fujisawa T, Mitsuoka T. Effects of green tea extracts on growth of intestinal bacteria. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 335-8.
26. Funosas ER, Martínez AB, Pignolo M, Maestri L, Aromando RF, Scozzarro SM et al. Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica. *Av Odontoestomatol* 2005; 21 (3): 159-66.
27. Okubo S, Toda M, Hara Y, Shinamura T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin. *Jpn J Bacteriol* 1991; 46: 509-14.
28. Valenzuela A. El consumo té y la salud: Características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Rev chil nutr [serie en línea]* 2004 [citado 31 Octubre 2006]; 31(2): 72-82: [3504] Disponible en: URL:[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182004000200001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000200001&lng=es&nrm=iso).
29. Salazar L. Té verde. [citado 31 Octubre 2006]. Disponible en: URL:<http://www.nutrinform.com.ar/pagina/info/teverde.html>.

30. Parra P. Té (*Camellia sinensis* L.) Dirección Nacional de Alimentos. [citado 07 Diciembre 2006]. Disponible en: URL:[http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r\\_34/cadenas/te.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_34/cadenas/te.htm).
31. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Ediciones Omega; 2000.
32. Siro I, Young-In K. Nutrition Reviews [online] 2000 [citado 07 Diciembre 2006]; 58: 1 – 10: [1687] Disponible en: URL:<http://www.labnutricion.cl/teysalud.htm>.
33. Jones C, Woods K, Whittle G, Worthington H, Taylor G. Sugar, drinks, deprivation and dental caries in 14-year-old children in the north west of England in 1995. Community Dent Health 1999; 16:68-71.
34. Moromi Nakata, Elba Martinez. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Odontol Sanmarquina 2006; 9(2):23-4
35. Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y Productos Naturales. Habana: Editoria Félix valera; 2001.
36. Boncun B, Zari G, Villalobos J, De los Ríos E, Ruíz S. Guía de Práctica de Farmacognosia I. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2006.
37. Sonnenwith L, Jareltt L. Métodos y Diagnóstico de Laboratorio Clínico. Tomo II. 8ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1983.
38. Brooks G, Batel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawest, Meldick y Adelberg. 16ª ed. México: El Manual Moderno; 1999.
39. Koneman W, Allen S, DoWel V, Jarda W, Sonden H, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Argentina: Panamericana; 1988.

40. Norman G, Streiner D. Bioestadística. Madrid: Harcourt Brace; 1998.
41. Snedecor G, Cochran W. Métodos Estadísticos. 4ª ed. México: Compañía Editorial Continental; 1997.
42. McKay D, Blumberg J. Review. The Role of Tea in Human Health: An Update. Journal of the American College of Nutrition 2002; 21 (1):1-13.

BIBLIOTECA DIGITAL DE POSGRADO