UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LA *CAMELLIA SINENSIS* (TÉ VERDE) FRENTE AL *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC 25175) Y AL *STREPTOCOCCUS SANGUINIS* (ATCC 10556)

TESIS

Para optar el título profesional de:

CIRUJANO DENTISTA

AUTOR
Gabriela del Pilar López Rodríguez

ASESOR DE TESIS:
Ph D. Juana del Valle Mendoza
CD. Esp. Juan Francisco Ceccarelli Calle

Lima, Perú
2014

DEDICATORIA

A Antonio y Elizabeth, mis padres, por ser mi ejemplo a seguir, gracias por todo el apoyo, paciencia y amor incondicional, porque con ustedes aprendí a dar mis primeros pasos y ahora les toca verme volar, esto es para ustedes…

A Ximena y Álvaro, mis hermanos, porque son mis cómplices en todo y tenerlos a mi lado me da las fuerzas y ganas de ser mejor cada día…

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me guió a lo largo de este camino lleno de obstáculos y me dio la fuerza para poder vencerlos

A la PhD. Juana del Valle Mendoza, docente e investigadora de la facultad de Ciencias de la salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, mi asesora, por sus palabras de aliento e impulso a seguir adelante a pesar de las adversidades, así como también por su tiempo, enseñanzas y colaboración en el presente estudio

Al CD. Esp. Juan Francisco Ceccarelli por brindarme su confianza y amistad desde el primer día que comenzamos a trabajar juntos

A la CD. Esp. Stefany Caballero por su aporte de conocimientos y motivación guiándome por el camino de un trabajo riguroso

A todo el equipo del IIN, Carmen Tinco Valdez, Verónica Casabona Oré y María del Carmen de Lama Odría, por su paciencia y apoyo en la elaboración del presente trabajo

RESUMEN

Objetivo: Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556).

Materiales y métodos: Se probaron dos extractos de té verde, uno comercial y otro a granel. Se utilizaron 24 discos para el primer extracto (Comercial) y la misma cantidad para el segundo extracto metanólico (Granel), se dividieron en grupos de 12 discos para cada bacteria, con un total de 4 placas petri por cada uno. Además, cada placa contenía 3 discos embebidos de té y 1 disco con Clorhexidina al 0.12% como grupo control. Estas muestras fueron analizadas con el método de difusión en agar con discos y los halos de inhibición se midieron a las 72 horas.

Resultados: Se encontró efecto antibacteriano para ambos extractos probados. El promedio del halo de inhibición para el extracto de té verde comercial fue de 19.72 mm y para el extracto de té verde a granel fue de 18.1 mm frente al *Streptococcus mutans*, mientras que para el *Streptococcus sanguinis* la media obtenida fue de 17.94 mm y 16.46 mm respectivamente. Con respecto a la Concentración mínima inhibitoria (CMI), para el caso de *Streptococcus mutans* se determinó una CMI de 0.08 gr/ml para el extracto comercial y al extracto a granel. Mientras que para el caso de *Streptococcus sanguinis* la CMI fue de 0.08 gr/ml para el extracto comercial y de 0.25 gr/ml para el extracto a granel.

Conclusiones: Ambos extractos metanólicos de té verde presentaron efecto antibacteriano contra las cepas del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556). El té verde comercial fue el que presentó mayor efecto antibacteriano que el extracto a granel.

Palabras claves: *Camellia sinensis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, Caries Dental

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of *Camellia sinensis* (green tea) on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcu*s *sanguinis* (ATCC10556).

Materials and Methods: The methanolic extract of green tea (commercial and bulk) was examined on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcu*s *sanguinis* (ATCC10556), using the well assay method. A total of 24 plates for the first extract (Commercial) and the same amount for the extract No. 2 (Bulk) were used and were divided into groups of 12 disks for each bacterium, with a total of 4 disks per group. In addition, each plate contained 3 disks embedded with tea and 1 disc with 0.12% chlorhexidine as a control group.

Results: It was found antibacterial effect in both methanolic extracts of green tea. No statistically significant differences when comparing the natural green tea with the other extract, in every single microorganism. A p value of 0.18 and 0.63 respectively were obtained. The methanol extract of the commercial green tea had better antibacterial effect than the second extract with an average of 19.72 mm, for the second extract of green tea was 18.1 mm against *Streptococcus mutans*, whereas for *Streptococcus sanguinis* was 17.94mm and 16.46 mm respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) for the commercial and bulk extract was 0.08 gr/ml against *Streptococcus mutans* and 0.08 gr/ml and 0.25 gr/ml against the strains of *Streptococcus sanguinis* respectively.

Conclusions: Both methanolics extracts, commercial and bulk have anti *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556) activity *in vitro*. The activity of commercial tea had better effects than the bulk methanolic extract.

Key words: sinensis, Camellia; *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, Dental caries

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

I. INTRODUCCIÓN 1

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1Planteamiento del problema 3

II.2Justificación 4

III. MARCO CONCEPTUAL 6

IV. HIPÓTESIS 17

V. OBJETIVOS 18

V.1Objetivo general 18

V.2 Objetivos específicos 18

VI. MATERIAL Y MÉTODOS 19

VI.1 Diseño del estudio 19

VI.2 Población y/o Muestra 19

VI.3 Operacionalización de Variables 21

VI.4 Técnicas y/o procedimientos 22

VI.5 Plan de análisis 26

VI.6 Consideraciones éticas 27

VII. RESULTADOS 28

VIII. DISCUSIÓN 35

IX. CONCLUSIONES 41

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42

GLOSARIO

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1 Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del té verde comercial y a granel frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) 30

Tabla 2 Concentración mínima inhibitoria según los diversos tipos de té verde sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) 32

Tabla 3 Comparación de la actividad antibacteriana de dos extractos de té verde frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) 34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Pág.

Gráfico 1 Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del té verde a comercial y granel frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) 31

Gráfico 2 Concentración mínima inhibitoria según dos extractos de té verde sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) 33

I. INTRODUCCIÓN

La fitoterapia es una ciencia ancestral que se encarga del estudio de la utilización de plantas con finalidades terapéuticas, ya sea para la prevención o tratamiento de un estado patológico. Sin embargo, actualmente siguen las investigaciones para poder confirmar si el efecto es el esperado sobre las condiciones de salud, debido a ello, se realizan con mayor frecuencia estudios para poder identificar los principios activos de los productos naturales responsables de la actividad farmacológica. [(1)] Con respecto a la odontología, se cree que algunas plantas tienen propiedades cuyos resultados contribuyen a contrarrestar los efectos de la halitosis, como complemento de la higiene oral, como barrera de protección de la caries dental, entre otros. Se sabe que la caries dental constituye una de las enfermedades más prevalentes en el ámbito oral, siendo además, de origen multifactorial que se caracteriza por la desmineralización de la superficie dental causada por bacterias adheridas a la misma. [(2)] Las bacterias que conllevan y contribuyen al desarrollo de esta patología se encuentran en forma de biofilm bacteriano. Es el *Streptococcus mutans* el microorganismo oral más importante en el desarrollo de la caries dental, mientras que el *Streptococcus sanguinis* se encarga de la producción de placa dental. [(3)]

El Perú es un país de gran biodiversidad y es muy usual que estas plantas sean utilizadas como medicina alternativa, existen estudios Etnobotánicos que dan a conocer los beneficios de los productos naturales. Dentro de los productos naturales con actividad antibacteriana en la cavidad oral tenemos *Propóleo*, *Erythroxylum novogranatense*, *Minthostachys mollis*, *Croton lachleri*. [(4)] La *Camellia sinensis* conocida comúnmente como té verde, cuyo origen

es asiático pero es cultivado en muchos países del mundo se caracteriza por poseer polifenoles, los cuales presentan un espectro amplio de actividad antiviral, antibacteriana, anticancerígena, entre otras [1, 5]

El propósito del presente estudio fue evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de la *Camellia sinensis* contra las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1 Planteamiento del problema

Datos del Ministerio de Salud, muestran que el Perú tiene uno de los índices más elevados de caries dental dentro de América Latina y es la enfermedad más prevalente en la cavidad oral con una incidencia del 90%, seguida de la enfermedad periodontal afectando a la población en un 85% [6,7]

Actualmente, la medicina natural se ha convertido en un tema muy reconocido y usado a nivel de la población; es por ello que ha recibido mucha atención por parte de los científicos, quienes van descubriendo nuevas propiedades y compuestos de diferentes plantas para que de esa manera pueda ser útil en diversos campos.[5] Una de las plantas estudiadas con propiedades antimicrobianas es la *Camellia sinensis* que en rasgos generales, se cree que es eficaz sobre varios microorganismos presentes en la cavidad oral y es utilizada como medicina alternativa. [5]

En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de *Camellia sinensis* frente a las cepas de *Streptococcus mutans y Streptococcus sanguinis;* bacterias responsables de caries dental y producción de placa bacteriana, con el fin de implementar estrategias complementarias en la prevención y tratamiento de esta enfermedad.

Actualmente en el mercado existen diferentes marcas comerciales de té verde, por este motivo se utilizaron dos productos de *Camellia sinensis* de diferente origen para comprobar el efecto antibacteriano frente a las bacterias anteriormente mencionadas.

Por ende surgió la pregunta:

¿Existe efecto antibacteriana *in vitro* de una solución a base de *Camellia sinensis* frente a las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)?

II. 2 Justificación

El estudio realizado fue de gran importancia en diferentes ámbitos; puesto que, a nivel teórico, complementa y aumenta el nivel de conocimientos adquiridos previamente sobre el uso del té verde (*Camellia sinensis*) y se optó por probar dos tipos de extractos para poder corroborar la eficacia de ambos.

Además, en el ámbito clínico puede ser usado como una solución a base de la misma planta, ya que podrá ser recomendada a pacientes con probable éxito, teniendo también un valor social muy elevado; puesto que se buscará el control de la enfermedad más prevalente dentro de la población peruana. Siendo así, una alternativa más dentro de nuestra higiene oral, teniendo un valor económico reducido, y al ser natural ocasionaría poco o ningún daño al organismo.

El propósito del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* frente a las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

III. MARCO CONCEPTUAL

Actualmente, se suele usar la terapia medicinal a nivel sistémico para contrarrestar efectos colaterales de ciertas enfermedades; es decir como medicina alternativa. Con respecto a la odontología, se sabe que hay gran cantidad de plantas que suelen ser usadas con el mismo motivo, entre ellas se encuentra la "*Camellia sinensis*" o comúnmente conocida como té verde.[1] Se ha demostrado que esta planta tiene propiedades antimicrobianas frente a diversos microorganismos comúnmente encontradas en la cavidad oral; es por ello que en el presente trabajo se comprobará la efectividad de la misma frente a las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* que son las causantes de la enfermedad más prevalente en la población en general, como la caries dental. [5]

Efectividad antibacteriana de la *Camellia sinensis*

El efecto antibacteriano es definido como la capacidad de producir la muerte a una bacteria por alguna sustancia; en otras palabras, provocan lisis en las mismas. [8] Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se hablará sobre el efecto antibacteriano que presenta la *Camellia sinensis* frente a diversos microorganismos.

El té verde es un producto hecho a partir de una planta llamada *Camellia sinensis,* se puede consumir como bebida y como extracto de las hojas para posteriormente usarlas como medicina alternativa. [9] Posee un amplio espectro inhibidor de microorganismos, ya que

dentro de sus principios activos responsables de la actividad terapéutica de la misma se destaca su contenido en compuestos polifenólicos (3% del total de compuestos químicos) que son de tres tipos: flavonoides, catecoles y taninos.[10] Sin embargo, se han identificado más de 300 ingredientes activos, pero los que mayor relevancia presentan son los polifenoles que son capaces de combatir agentes patógenos como el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis.* [11]

Aunque la cavidad oral presenta una flora mixta, se sabe que la bacteria más prevalente es el *Streptococcus mutans,* [11] microorganismo responsable de la aparición de la caries dental. *S. mutans* es una bacteria gram-positiva, esférica, anaerobia facultativa, perteneciente al grupo de bacterias ácido-lácticas, suele colonizar particularmente las fisuras de los dientes y las superficies interproximales, posee propiedades que se encuentran asociadas con el poder cariogénico de un microorganismo como: avidez por la sacarosa, producción elevada de ácido láctico, capacidad de crecer óptimamente en medio ácido y la capacidad de sintetizar polisacáridos que le sirven como reserva de nutrientes y de adherencia a la superficie dental. [12]

Otra bacteria responsable de la caries dental es el *Streptococcus sanguinis*, antiguamente llamada como *Streptococcus sanguis*, pertenece a la familia de *Streptococcaceae* de género *Streptococcus*. [2,3] *S. sanguinis* es la encargada de la producción de placa dental, coloniza la cavidad oral de los niños después del inicio de la erupción dental y se demostró que es el primer microorganismo que se instala en superficies dentarias limpias. [2,3] Sin embargo, el potencial cariogénico de esta bacteria es muy baja en comparación al *Streptococcus mutans*

y según estudios la proporción de ambas podría actuar como un indicador para el riesgo de caries. [3]

***Camellia sinensis* "té verde"**

La *Camellia sinensis*, nombre científico del té verde, es la segunda bebida más consumida a nivel mundial, seguida del agua mineral. [10] Con respecto a la clasificación científica, es perteneciente al reino: *Plantae*, Orden: *Ericales*, Familia: *Theaceae*, Género: *Camellia*, Especie: C. *Sinensis*, Nombre binomial: *Camellia sinensis.* [13]

Se caracteriza por ser un arbusto o árbol de pequeña estatura, generalmente se poda para limitar su porte por debajo de dos metros cuando se cultivan las hojas para elaborar té y así se facilita la cosecha. La raíz es pivotante y fuerte, sus flores son de color amarillo-blanco, tiene 2.5-4 cm de diámetro, con 7 a 8 pétalos. Las semillas de *Camellia sinensis* y *Oleifera* se puede usar para obtener el aceite del té, sus hojas son de 4- 15 cm de largo y de 2-5 cm de ancho; cuando las hojas son jóvenes tienen un color verde claro, que son preferiblemente cosechados para la producción del té, las hojas más viejas son de otra tonalidad de verde (más oscuro), según las edades de estas, la calidad del té puede variar ya que su composición química es diferente. Por lo general, la punta, conocida también como yema y las dos a tres primeras hojas se cosechan para uso exclusivo de ser procesadas, esta recolección se ejecuta cada dos semanas. [10] Existen variedades de flores, algunas son de floración invernal, mientras que otro grupo lo hace en primavera; no obstante, todas ellas son acidófilas por lo que se necesita un sustrato con pH ácido. Suele florecer en primavera

y fructifica en verano/otoño, se cultiva con alto éxito, y es capaz de soportar desde el nivel del mar hasta los 2.200 msnm, se obtiene además producciones de alta calidad en zonas que tienen alturas superiores a 1.200 msnm. (13)

Esta planta es proveniente del Asia y se cultiva por lo menos en 20 países de todo el mundo. Fue introducida al continente americano a finales del siglo XVII donde adquirió el nombre de "Chinesse Tea". El nombre *Camellia* se debe al misionero jesuita George Joseph Camel quien realizó diversas investigaciones para poder conocer su utilidad y fue en honor a su apellido que al ser traducido al latín es "*Camellus*". (13)

Con respecto a las características botánicas de la especie en estudio, el cultivo de esta planta ha ido aumentando con el paso del tiempo y actualmente se cultivan en los cinco continentes, a partir de sus brotes y hojas se procesan diversos tipos de té; entre ellos se encuentran: té negro, verde, rojo y blanco. El té negro es el resultado de un proceso de fermentación completa, proceso de oxidación, este producto presenta mayores propiedades aromáticas, y debido a su alto contenido de flavonoides se encarga de la protección del sistema cardiovascular. Si se compara con el té rojo, este presenta fermentación incompleta, con un grado de 50-60% de la misma, denominado "*Oolong*" mientras que con 8-25% se conoce como "*Pouchong*", luego del secado de hojas y yemas se aplica un tratamiento térmico que sirve básicamente para inactivar las enzimas, detener la fermentación en el momento adecuado y quitarle humedad para evitar la descomposición posterior de las hojas. Si de bondades se trata, este tipo de té, presenta propiedades antioxidantes, efectos protectores del sistema cardiovascular, se usa además como tratamiento complementario

para la obesidad y se le atribuyen propiedades anticancerígenas. El otro tipo de té, es el blanco, que carece de fermentación, y es producido a partir de yemas nuevas recolectadas antes de ser abiertas, se dejan marchitar para que se evapore la humedad y se desequen, como propiedad principal tiene el alto nivel de antioxidantes presente. Por último, nuestra planta en observación, té verde, al igual que el blanco, carece de fermentación, se evita la acción enzimática de la fermentación mediante un escaldado, presenta también elevadas cantidades de antioxidantes, colabora con la nivelación de insulina en sangre y la disminución de la grasa corporal, disminuye el nivel de triglicéridos y colesterol. [14, 15]

Por otro lado, el té verde ha sido considerado una medicina y bebida curativa desde tiempos remotos, es más, la medicina tradicional China, la ha recomendado para dolores de cabeza, digestión, depresión, energizante, y en general, para prolongar la vida. [11] Cada hoja de este té, contiene componentes que son primordiales, actuando de esa manera como beneficiario para la salud humana; dentro de ellas se encuentran, bases xánticas (cafeína y teofilina), aceites esenciales y componentes polifenólicos. La cafeína suele actuar principalmente a nivel del sistema nervioso central (SNC), estimulando la vigilia, facilitando así la asociación de ideas y disminuyendo la sensación de fatiga. [16] Algunos efectos ocasionados por la cafeína son influenciados por la teofilina, esta a su vez, induce la actividad psicoactiva; además de poseer un leve efecto inotrópico y vasodilatador, y si se compara con la cafeína, esta teofilina tiene un mayor efecto diurético; pese a ello, sus efectos más interesantes se pueden apreciar a nivel respiratorio y broncopulmonar, también es causante de relajación en el músculo bronquial y la estimulación respiratoria. [16,17]

Los aceites esenciales son volátiles y se evaporan de la bebida, por ello no es muy conveniente extender el tiempo de filtración. El té verde es el tipo de té con mayor porcentaje de aceites esenciales; además, ha recibido gran atención debido a su contenido en polifenoles (fuertes antioxidantes y presentan propiedades biológicas). Se demostraron con estudios que el extracto acuoso de epigalocatequinas (GTP) posee propiedades antimutagénicas, antidiabéticas, antibacterianas, antiinflamatorias e hipocolesterolémicas, también brinda beneficios sobre enfermedades orales; tales como barrera contra la caries, enfermedad periodontal y disminución de la halitosis. Entre todas las epigalocatequinas (GTP), hay dos que se consideran como verdaderos intervinientes en los diferentes efectos, estos son las catequinas y ácidos gálicos. Por otro lado, se mencionarán a los más importantes; tales como, actividad antioxidante, potencial antimutagénico y anticarcinogénico, efecto antihipertensivo y riesgo de enfermedad cardiovascular, protección solar ultravioleta, suplemento de insulina y salud oral en general. Sin embargo, aún se continúan con una serie de estudios principalmente por investigadores, en las que se pudo evidenciar la efectividad antimicrobiana propia del extracto de este tipo de té, sobre todo en lo relacionado a la Odontología. [15, 17]

En el 1998, Rasheed A. y col. investigaron la actividad antibacteriana de diferentes extractos de té (verde y negro) y lo compararon con otros fármacos que son usados para el tratamiento de la caries dental. Observaron que extractos del té verde tenían mayor actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus salivarius* que extractos del té negro, comparando estos resultados con amoxicilina, cefradina y eugenol. [18]

En el 2006, Moromi H. y col. determinaron el efecto de la infusión del té verde al 10 % en la formación de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*; sucesivamente cada 24 horas, por 7 días. Los resultados demostraron la notoria disminución y falta de adherencia en la formación de la placa bacteriana en el alambre de nichrone de los cultivos con infusión de té verde en relación al cultivo control. [(5)]

En el 2007, Moromi H. determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* de soluciones de *Camellia sinensis* de cuatro marcas comerciales (A, B, C y D), recolectando saliva de 40 estudiantes universitarios, posteriormente, se incubaron las placas a 37° C/ 24 horas, y se observaron los halos de inhibición del crecimiento de colonias. Se concluyó que los extractos presentaron acción antibacteriana para la cepa de *Streptococcus mutans*, así como para la microflora mixta salival y que además existe diferencias en la acción dependiendo de la marca utilizada. [(11)]

En el 2008, Hassani AS. y col. evaluaron la eficacia del extracto fermentado y no fermentado de la *Camellia sinensis* (té verde y negro) y los compararon con el *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis*. La capacidad mínima inhibitoria de ambos extractos fueron evaluados con el método de difusión y de caldo. Se obtuvieron como resultados que ambos extractos eran capaces de prevenir el crecimiento bacteriano. [(19)]

En el 2008, Tzung-Hsun T. y col. determinaron el efecto antibacteriano del *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* frente a 12 extractos; además de hallar la capacidad total

de antioxidantes y los constituyentes fenólicos de 11 diferentes extractos metanólicos y las compararon con el té verde. Los resultados mostraron que solamente ocho inhibieron el crecimiento del *Streptococcus sanguinis*, el té verde presentó este efecto pero en menor potencia en comparación a los otros (Concentración mínima inhibitoria de 1mg/ml). Por otro lado, se llegó a la conclusión que el té verde puede ser una fuente de antioxidante natural. [20]

En el 2009, Paredes N. determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de una solución a base de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* frente a flora bacteriana salival mixta, recolectando saliva de 30 niños del servicio de Ortodoncia y Ortopedia Maxilar del Instituto de Salud del Niño y se sembró en medio Agar Tripticasa Soya (TSA). Se utilizó el medio de difusión por discos para las soluciones de té verde y muña, los resultados demostraron la efectividad antibacteriana de las soluciones de *Camellia sinensis y Minthostachys mollis* siendo su efectividad similar a la mostrada por la clorhexidina y Vitis Orthodontics®. [21]

En el 2010, Alvarado V. y col. compararon la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes extractos hidroalcóholicos de tres plantas medicinales: *Plantago major*, *Erythroxylum novograntense var truxillense* y *Camellia sinensis* mediante el método de difusión en agar con discos, frente a las siguientes cepas bacterianas: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenicus* y *Fusobacterium nucleatum*. Como grupo control se tuvo a la clorhexidina al 0.12% (PerioAid®) y alcohol

etílico al 70%. Los tres extractos presentaron actividad antibacteriana; sin embargo, la *Camellia sinensis* obtuvo la mayor actividad. [22]

En el 2010, Sarmiento L. evaluó la existencia de propiedades antibacterianas de dos extractos té verde sobre bacterias orales de importancia estomatológica: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius*. Se determinó el efecto antibacteriano y la viabilidad celular de estas tres cepas, se comparó dos extractos para hallar el del mejor resultado, obteniendo que el extracto alcohólico presentó una ligera mejor acción antimicrobiana a diferencia del extracto acuoso. [23]

En el 2011, Hamidreza A. y col. realizaron una revisión sobre las propiedades terapéuticas que presenta la *Camellia sinensis* con respecto a la salud oral en general, explicaron diferentes documentos sobre cómo diversos suplementos podrían mejorar la salud oral. Finalmente, sugirieron que el beber té verde con frecuencia puede ayudar a mantener una correcta salud oral. [24]

En el 2011, Jalayer N. y col. determinaron la actividad antimicrobiana del té verde de Irania y el té negro contra las cepas del *Streptococcus mutans*. Se recolectó la *Camellia sinensis* de una provincia de Irania, llamado Lahijan. Se evaluaron cinco concentraciones diferentes (50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml, 300mg/ml and 400 mg/ml) del extracto etanólico del té verde y negro, se usó el agar dilución. El té verde y negro iraní tuvo un efecto antibacterial de 100 a 400 mg/ml. La concentración mínima inhibitoria del té verde fue de 150 mg/ml y del té negro fue de 50mg/ml. La zona de inhibición fue de 9.5 mm y

10.9 mm para el té verde y negro respectivamente. Los resultados fueron que ambos presentaban efecto anti *Streptococcus mutans*; aunque fue el té verde el que lo presentó en mayor cantidad. [12]

En el 2011, Tahir A. y col. compararon la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico del té verde de una muestra comercial frente al *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans* mediante el método de difusión. Encontraron que el extracto acuoso produjo zonas de inhibición de 6 a 18 mm. y de 8 a 27 mm. frente a *L. acidophilus* y *S. mutans* respectivamente; sin embargo, el extracto etanólico tuvo halos de inhibición de 15 a 33 mm. y 19 a 35 mm. Otro aspecto que se evaluó fue la CMI, para el extracto etanólico la medida fue de 0.7 mg/ml en ambas bacterias; mientras que para el extracto acuoso fue de 0.9 mg/ml y 0.8 mg/ml para *L. acidophilus* y *S. mutans*. Los resultados mostraron que el extracto etanólico del té verde tenía mejor actividad antibacteriana frente al extracto acuoso de té verde. [25]

En el 2011, Hajenorouzali M. y col. tuvieron como objetivo comparar el efecto de un enjuagatorio de fluoruro de sodio y uno elaborado de té verde sobre el nivel de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* presentes en la saliva de niños. Se realizó un control aleatorio de 60 niños (8-12 años) y se dividieron en dos grupos, fueron instruidos para usar un enjuague de 0.05% de fluoruro de sodio o de 0.05% de té verde dos veces al día por dos semanas. Se midió el nivel de bacterias en saliva al inicio y al finalizar la intervención. No se mostraron diferencias estadísticamente significativas de las colonias bacterianas tanto

antes como después de la intervención. Se concluyó que el té verde podía ser usado en los niños ya que no presenta efectos adversos en comparación al flúor. [26]

IV. HIPÓTESIS

El extracto de la *Camellia sinensis* tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556).

V.2. Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano del té verde comercial y a granel frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556).

2. Determinar la concentración mínima inhibitoria según dos extractos de té verde sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556).

3. Comparar la actividad antibacteriana de dos extractos de té verde frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Diseño del estudio

El diseño del estudio fue de tipo experimental *in vitro.*

VI.2. Población/Muestra

La unidad de análisis fue conformado por discos embebidos por extractos metanólicos impregnados sobre cultivos de cepas de *Streptococcus mutans* **(ATCC 25175)** y el *Streptococcus sanguinis* **(ATCC 10556)** obtenidas de manera comercial de GenLab del Perú S.A.C. El tamaño muestral estuvo determinado mediante una fórmula estadística (estimación de medias) en base a los datos obtenidos en la prueba piloto **(Anexo 1)**.

Se formaron los siguientes grupos:

- **Grupo 1:** Cultivo *Streptococcus mutans* frente a extracto metanólico Nº 1 de *Camellia sinensis*

- **Grupo 2:** Cultivo *Streptococcus mutans* frente a extracto metanólico Nº 2 de *Camellia sinensis*

- **Grupo 3:** Cultivo *Streptococcus sanguinis* frente a extracto metanólico Nº 1 de *Camellia sinensis*

- **Grupo 4:** Cultivo *Streptococcus sanguinis* frente a extracto metanólico Nº 2 de *Camellia sinensis*

- **Grupo 5:** Clorhexidina al 0.12% como grupo control

VI.3. Operacionalización de Variables

Variable	Definición Operacional	Indicadores	Tipo	Escala de medición	Valores
Efectividad antibacteriana	Inhibición en el desarrollo o crecimiento de las bacterias debido a la presencia del extracto metanólico de la *Camellia sinensis*	Método de difusión en agar con discos	Cuantitativo	Razón	Milímetros
Extracto metanólico de *Camellia Sinensis*	Sustancia antibacteriana a diferentes concentraciones con propiedades beneficiosas para la salud oral	Asignación de la sustancia experimental	Cualitativo	Nominal	-Granel -Comercial
Concentración mínima inhibitoria	Concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo	Método de difusión en agar con discos	Cuantitativo	Razón	Milímetros

VI.4. Técnicas y Procedimientos

Obtención de las cepas bacterianas

En el presente estudio se utilizaron 2 cepas bacterianas comerciales *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), obtenidas de manera comercial (GenLab del Perú S.A.C).

El cultivo de las cepas se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, por el investigador principal, bajo la supervisión de una microbióloga antes de realizar el cultivo de las cepas.

Las cepas bacterianas comerciales fueron rehidratadas y cultivadas en placas de TSA (Trypticase Soy Agar) según las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis, a 37°C durante 5 días. **(Anexo 2)**

Obtención de la muestra

Las hojas secas de *Camellia Sinensis* fueron adquiridas de dos formas:

Extracto Nº 1: en forma del producto comercial té verde "Renacer®", tipo granel por 250 gr. que contiene 100% hojas de té verde. [11]

Extracto Nº 2: en forma de hojas naturales secas, compradas en el Mercado Central (Calle Capón) tipo granel por 100 gr. **(Anexo 3)**

Extracto metanólico a partir de *Camellia sinensis*

Se prepararon dos extractos metanólicos de té verde: a) extracto metanólico de té verde Comercial y b) extracto metanólico de té verde a granel. Ambos extractos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento.

Para cada extracto, en un frasco limpio y estéril, se adicionó 57 gramos de hojas secas de *Camellia sinensis* y 172 ml de metanol puro (Merck peruana), la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 7 días. Los frascos conteniendo la mezcla fueron cubiertos con papel plata y aislados de la luz solar.

Transcurridos los 7 días, en un tubo falcón de 50 ml se filtró cada uno de los extractos, para lo cual se utilizó un embudo con papel filtro Wathman nº 44. Posteriormente, los extractos fueron evaporados un 30% a 55°C (4 horas aprox) [27, 29] **(Anexo 4)**

Efecto antibacteriano

Efecto de dos productos naturales como agentes antibacterianos frente al *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sanguinis*. Fue utilizado para determinar la capacidad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* y al *Streptococcus sanguinis*. La actividad antibacteriana se analizó por dos métodos: Difusión en agar con discos y Concentración mínima inhibitoria [27, 29]

Preparación del agar Trypticase Soy Agar (TSA)

Se pesó en la balanza analítica dos tubos de precipitados con 10 gr. del agar TSA en cada uno y se vació el contenido de cada tubo en su respectiva botella estéril y se le agregó 250 ml de agua destilada, se homogeneizó el contenido y se introdujo ambas botellas a la autoclave durante 20 minutos.

Preparación de las placas Petri

Se retiraron con sumo cuidado las botellas de la autoclave, se esperó a que la temperatura descienda un poco para empezar con la preparación de las placas Petri. A cada botella del agar TSA se le suplementó con 50 ml de sangre de cordero estéril desfibrinada, se homogeneizó el contenido y se vertió en las placas Petri de 15cm de diámetro evitando generar burbujas, se esperó a que el medio solidifique para finalmente rotular cada placa antes de iniciar la siembra.

Difusión en agar con discos

Se utilizó discos de papel Wathman de 6 mm de diámetro, estos fueron esterilizados para lo cual se colocaron dentro de una pequeña placa petri y se introdujo dentro de la campana bajo condiciones de esterilización (ultravioleta) durante 15 minutos.

Las bacterias fueron inoculadas en las placas de Tryptic Soy Agar (TSA), para lo cual se utilizó 200 µl de cada suspensión bacteriana 0.5 McFarland y con ayuda de un hisopo de

dacrón estéril se dispersó las bacterias por todo el agar hasta formar una placa homogénea. Las placas se dejaron reposar unos minutos antes de proceder con el ensayo antimicrobiano.

Posteriormente, 30 µl de cada extracto metanólico de té verde y de Clorhexidina al 0.12% (control positivo) fueron adicionados a cada uno de los discos de papel Wathman, luego estos fueron sobrepuestos en las placas de agar TSA inoculadas con las bacterias evaluadas. Se siguió el mismo procedimiento para todos los casos, incluido el control positivo.

Para cada una de las muestras se realizaron 12 repeticiones de cada uno de los extractos y para cada una de las bacterias. Al finalizar todas las placas, se selló con papel parafilm y las muestras se incubaron a 37ºC durante 72h en condiciones de anaerobiosis. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir los diámetros de cada halo de inhibición, para lo cual se utilizó un Vernier para medir el diámetro del halo de inhibición.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se utilizó el método de difusión en agar con discos siguiendo el protocolo anterior en la preparación del agar TSA, se prepararon un total de 10 placas para cada uno de los casos. Se utilizaron diluciones seriadas de los dos extractos, para lo cual se utilizó solución salina PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X. Con la micropipeta se llenaron las diferentes diluciones en cada tubo de Eppendorf, para la Dd1 se usó 1000 µl stock (extracto metanólico de té verde), para la Dd2 375 µl stock y 125 µl PBS 1x, Dd3 250µl stock y 250µl PBS 1x, Dd4 125 µl stock y 375 µl PBS 1x y por último la Dd5 con PBS 1x (control negativo). Se empapó un disco de papel Wathman estéril de 6mm de diámetro en el tubo

con la Dd1 y se sobrepuso en la placa petri que se encontraba previamente cultivada con la bacteria trabajada, se realizó lo mismo para las siguientes diluciones. Las placas fueron selladas e incubadas en anaerobiosis a 37ºC durante 72h. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir los diámetros de cada halo de inhibición, para lo cual se utilizó un Vernier para medir el diámetro del halo de inhibición **(Anexo 5).**

VI.5. Plan de análisis

Para el análisis univariado, se procedió a obtener la estadística descriptiva (media, mediana y desviación estándar) de las variables en estudio, registradas en una tabla de frecuencia.

Además, se determinó si la muestra tenía distribución normal mediante la prueba de Shapiro –Wilk.

Para el análisis bivariado se utilizó la prueba de U de Mann Whitney por no presentar distribución normal para comparar la efectividad de dos extractos metanólicos de té verde frente a diferentes bacterias.

Se utilizaron los programas de Microsoft Excel y Stata® versión 12.0 para el vaciado de datos y análisis de datos respectivamente.

VI.6. Consideraciones éticas

Se procedió a realizar una solicitud dirigida al comité de ética de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas para obtener la exoneración de la misma, debido a que es un estudio experimental *in vitro* que no implicó el trabajo con humanos ni animales.

VII. RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo determinar y comparar en un sistema *in vitro* la efectividad antibacteriana de dos extractos metanólicos diferentes de *Camellia sinensis* (té verde) contra las cepas de *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556) y *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Los extractos metanólicos fueron preparados teniendo como base el té verde comercial (extracto 1) y té verde a granel (extracto 2). Para cada caso se realizaron 12 pruebas independientes y como control positivo se utilizó la solución de Clorhexidina al 0.12%. Los resultados mostraron, que el té verde comercial frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* tienen efecto antibacteriano, arrojando un halo de inhibición de 19.72 mm. y 17.94 mm. respectivamente. Mientras que el té verde a granel mostró halos de inhibición de 18.1 mm. y 16.46 mm frente al *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* respectivamente. Concluyendo que el extracto de té verde comercial tiene un efecto antibacteriano mayor con respecto al extracto de té verde a granel para ambas bacterias analizadas.

En la tabla 1, se encontró que el promedio del efecto antibacteriano del té verde comercial para el *Streptococcus mutans* fue de 19.72 $\pm$ 3.20 mm. y el té verde a granel presentó una media de 18.1 $\pm$ 1.84 mm. para el mismo microorganismo. Para el caso del *Streptococcus sanguinis*, se observó que el tamaño de los halos de inhibición fue de 17.94 $\pm$ 1.61 mm. y 16.46 $\pm$ 5.12 mm. con té verde comercial y a granel respectivamente. **(Gráfico 1)**

La tabla 2, muestra el promedio de concentración mínima inhibitoria (CMI), para lo cual se utilizaron diferentes concentraciones del té verde comercial y a granel. Los extractos fueron sometidos frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) de manera independiente. Para el caso del *Streptococcus mutans*, ambos extractos metanólicos de té verde tuvieron un valor de 0.08 gr/ml. Para el caso de *Streptococcus sanguinis*, la concentración mínima inhibitoria para el extracto de té verde comercial fue de 0.08 gr/ml; mientras que para el extracto a granel fue de 0.25 gr/ml. **(Gráfico 2)**

Se realizó una comparación del efecto antibacteriano de dos extractos de té verde frente a las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Para ambos casos, se trabajó con la prueba de U de Mann Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el té verde comercial con el té verde a granel en cada uno de los microorganismos. Se obtuvo un p valor de 0.182 y 0.629 respectivamente. **(Tabla 3)**

TABLA 1

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del té verde comercial y a granel frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556)

Bacteria	Grupo	Media (mm)	Mediana (mm)	D.E (mm)	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	Normalidad*
S.mutans	**Té verde comercial**	19.72	19.6	3.20	15.7	29	0.010
	Té verde a granel	18.1	17.9	1.84	15.6	20.5	0.067
	Clorhexidina al 0.12%	19.83	19.5	2.06	16.4	24.5	0.543
S. sanguinis	**Té verde comercial**	17.94	17.7	1.61	15.1	20.2	0.390
	Té verde a granel	16.46	17	5.12	0	20.4	0.000
	Clorhexidina al 0.12%	19.8	19.7	1.18	18	21.8	0.822

Prueba de Shapiro Wilk

Nivel de significancia estadística, ($p<0.05$)

GRÁFICO 1

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del té verde comercial y a granel frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556)

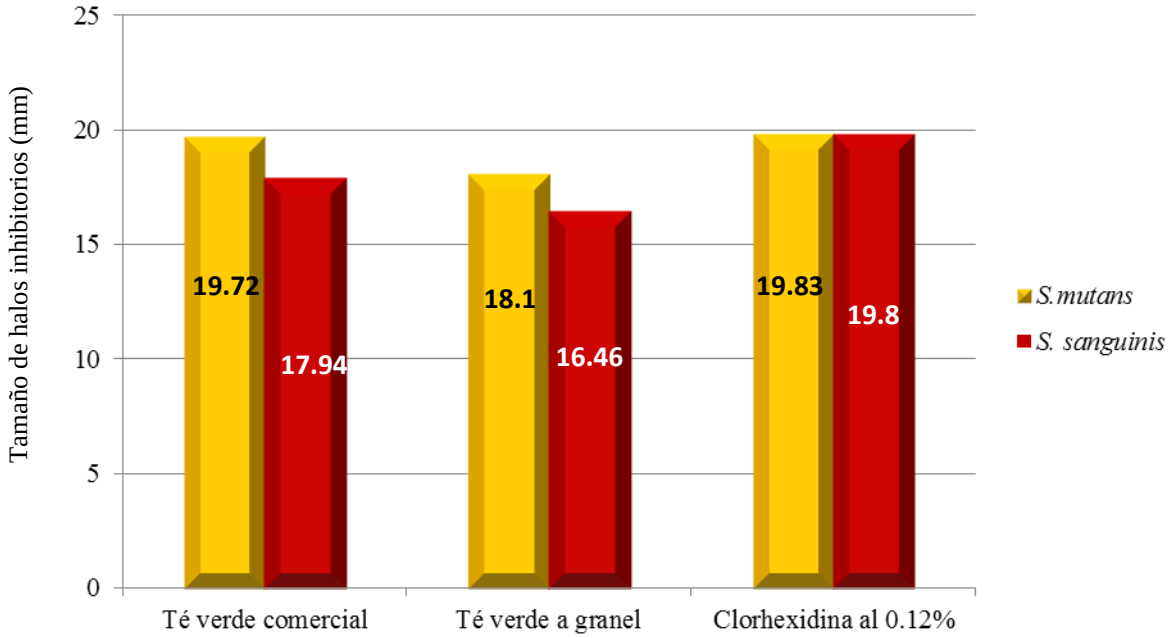


TABLA 2

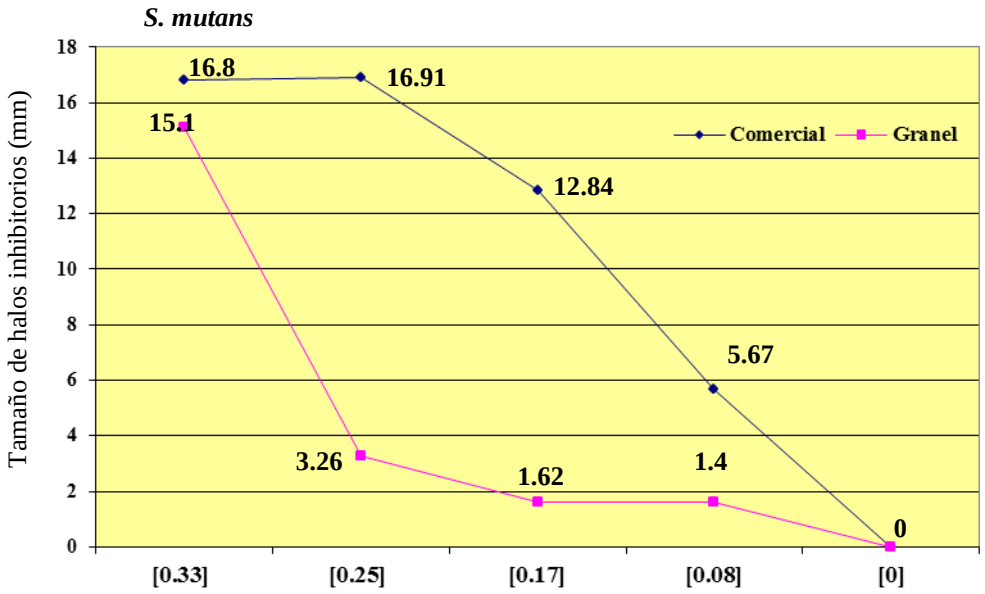
Concentración mínima inhibitoria según dos extractos de té verde sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)

Bacteria	**Tipo de té**	**Concentraciones en gr/ml**				
		[0.33]	**[0.25]**	**[0.17]**	**[0.08]**	**0**
S. mutans	**Comercial**	16.8mm	16.91mm	12.84mm	5.67mm	0
	Granel	15.1mm	3.26mm	1.62mm	1.4mm	0
S. sanguinis	**Comercial**	17.7 mm	16.58 mm	10.6 mm	4.04 mm	0
	Granel	15.19 mm	2.01 mm	0	0	0

mm: Tamaño de los halos de inhibición

GRÁFICO 2

Concentración mínima inhibitoria según dos extractos de té verde sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)



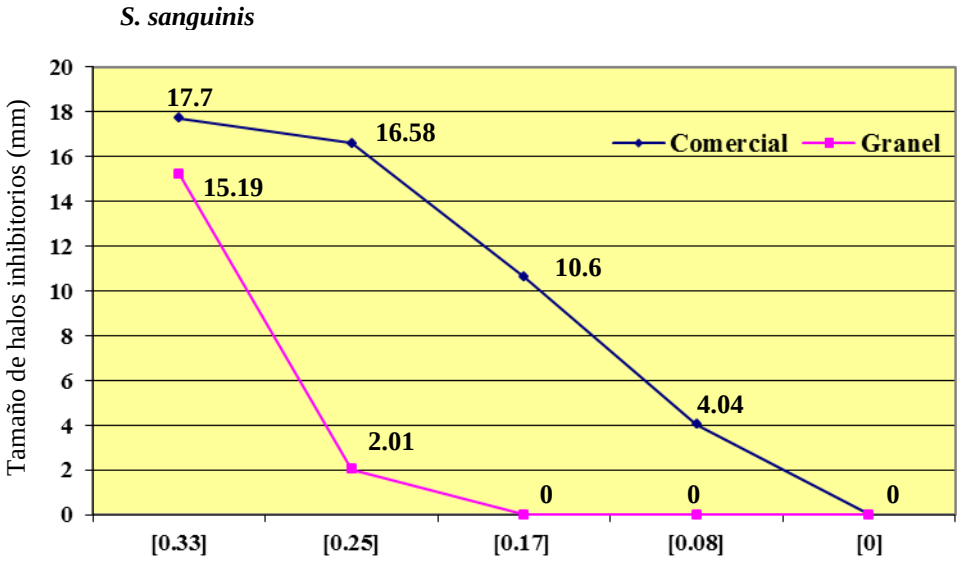


TABLA 3

Comparación de la actividad antibacteriana de dos extractos de té verde frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)

Bacteria	Efecto antibacteriano	Media (mm)	Mediana (mm)	D.E (mm)	U de Mann Whitney
S. mutans	**Té verde marca comercial**	19.72	19.6	3.20	0.182
	Té verde a granel	18.1	17.9	1.84	
S. sanguinis	**Té verde marca comercial**	17.94	17.7	1.61	0.629
	Té verde a granel	16.46	17	5.12	

***Nivel de significancia $p<0.05$**

VIII. DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio fue evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de la *Camellia sinensis* (té verde) frente a las cepas del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556). En el estudio se evaluaron dos tipos de té verde: comercial (Renacer®) y a granel (obtenido en la calle Capón). Existen numerosos estudios internacionales que muestran la actividad antibacteriana del té verde, sin embargo no existen estudios reportados que prueben el té verde comercializado dentro del Perú, por eso en este estudio se propuso evaluar la actividad antibacteriana de dos tipos de té verde distribuidos en nuestro país frente a bacterias orales. Para el desarrollo del ensayo antibacteriano se realizaron 24 ensayos para el extracto metanólico de té verde comercial y la misma cantidad para el extracto a granel.

Se define al efecto antibacteriano como la capacidad que presenta una sustancia para inhibir el crecimiento bacteriano. Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizan diferentes técnicas pero las más utilizadas son: difusión en agar con discos y difusión en pozo. Para la presente investigación, esta variable fue medida por la técnica de difusión en agar con discos o método de Kirby Bauer; similar a lo realizado por Jalayer y col en el año 2007 [12], este procedimiento consiste en el uso de discos de papel absorbente que son impregnados con el extracto para luego ser colocados en el agar de una placa petri, en la que se debe inocular previamente una suspensión de la cepa bacteriana con la que se experimentará. [30]

El *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans*, son dos de los microorganismos más comunes en la cavidad oral. El *Streptococcus mutans*, es el causante de una enfermedad muy común en la población peruana como la caries dental. [6, 7] Se caracteriza por ser gram-positiva, anaerobia facultativa, tiene la capacidad de crecer en óptimas condiciones dentro de un medio ácido y degrada carbohidratos (lactosa y sacarosa) mediante la producción de ácido láctico, lo que ocasiona la erosión del esmalte. [12, 31] Por otro lado, tenemos al *Streptococcus sanguinis* que es de la especie de *S. Viridans*, el cual es el encargado de la formación de la placa dental, colonizando la cavidad oral después del inicio de la erupción dental. [2,3] Sin embargo, al comparar al *Streptoccocus mutans* y al *Streptococcus sanguinis*, el potencial de producir caries es muy baja para esta última. [3] Investigaciones previas han evaluado el efecto antibacteriano de diferentes extractos naturales sobre estos microorganismos; por este motivo, el presente estudio ha considerado evaluar estas bacterias por su importancia en la cavidad oral. [4,8, 32, 33, 34]

La *Camellia sinensis* o más conocida como té verde, se caracteriza por presentar capacidad para inhibir microorganismos, dentro de sus principios activos se encuentran los compuestos polifenólicos, siendo los más importantes las catequinas. [31] Los numerosos beneficios que tiene el té verde para la salud son el resultado del gran porcentaje de polifenoles encontrados; tales como, la presencia de propiedades antioxidantes, efectos protectores del sistema cardiovascular, complemento para el tratamiento contra la obesidad y propiedades anticancerígenas. [14,35] Por otro lado, se conocen también las bondades que la *Camellia sinensis* presenta en la cavidad oral, entre las que destacan, barrera contra la caries dental, enfermedad periodontal y disminución de la halitosis. [14] Se decidió trabajar

con este extracto debido a que el té verde es la segunda bebida más consumida a nivel mundial [35], por lo cual de corroborarse sus beneficios a nivel odontológico podría tener un impacto sobre una de las enfermedades más prevalentes, siendo usado como una solución natural, con un valor económico reducido.

Los resultados encontrados fueron analizados con la prueba de U de Mann Whitney, se halló efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* contra las cepas de *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans*. Sin embargo, al comparar el té verde a granel y el té verde comercial en cada uno de los microorganismos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Los hallazgos del presente trabajo permite evidenciar las propiedades antibacterianas de la *Camellia sinensis* coincidiendo con estudios previos de Moromi [11] quien realizó una serie de investigaciones *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*, en donde se obtuvo resultados similares. Asimismo, Rasheed A y Haider M. [18] compararon diferentes extractos de té (verde y negro), y observaron que el té verde tenía mayor actividad frente a *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus salivarius* que extractos del té negro. Paredes N. [21], determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de una solución a base de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* frente a flora bacteriana salival mixta, los resultados demostraron la efectividad antibacteriana de las soluciones de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* siendo su efectividad similar a la mostrada por la Clorhexidina y Vitis Orthodontics®. Además, un estudio reciente compara dos tipos de extracto de té verde, acuoso y etanólico frente al *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*, en ambos

casos se halló la efectividad antibacteriana y se demostró que el extracto etanólico obtuvo mayores halos de inhibición en comparación con el extracto acuoso. [25] Sin embargo, en el presente estudio se utilizó el extracto metanólico de té verde ya que se sabe que este producto tiene la capacidad de extraer mayor número de compuestos químicos, tales como los polifenoles y fenoles. Está descrito en la literatura que estos componentes tienen actividad antibacteriana, antifúngica y anticancerígena. [15,17] Este efecto antibacteriano puede deberse a los mecanismos de acción que producen los polifenoles en altos niveles de té verde frente a estas bacterias, ya que son capaces de influir en el proceso de formación de caries en etapas diferentes: puede inhibir la proliferación del agente estreptocócico e interferir con el proceso de adhesión al esmalte dental. [4, 15, 25, 26, 36] Las catequinas pueden actuar como inhibidoras de la glucosiltransferasa y amilasa lo que conduce a la reducción de la placa dental, además de poder inhibir la metaloproteinasa de la matriz que se localiza en la saliva y dentina, pudiendo ser responsable de la degradación de la matriz en lesiones de caries de dentina. [26, 36, 37] A diferencia de los estudios descritos en la literatura, los cuales usan extractos acuosos o etanólicos, nuestro extracto metanólico nos arroja un resultado más eficiente por la característica de los compuestos extraídos a partir del té verde comercial y a granel.

Otro objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antibacteriano del té verde frente al *Streptococcus sanguinis*, Hassani AS. y col [19] evaluaron la eficacia del extracto fermentado y no fermentado de la *Camellia Sinensis* (té verde y negro) frente a cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis* y al igual que el presente estudio, obtuvieron como resultados que ambos extractos tenían la capacidad de

inhibir el crecimiento bacteriano. Tzung-Hsun T. y col [20] realizaron un estudio similar y compararon diferentes hierbas frente al crecimiento de *Streptococcus sanguinis*, el té verde presentó efecto antibacteriano pero en menor potencia en comparación a las otras 12 hierbas. Sin embargo, no existe mucha información relacionada al efecto que presenta el té verde frente al *Streptococcus sanguinis*, siendo así el primer estudio en el Perú que evaluó la actividad antibacteriana de este microorganismo.

Por último, se halló la concentración mínima inhibitoria (CMI) que está definida como la concentración más baja de extracto que inhibe visiblemente el crecimiento de algún organismo. En este caso, se determinó la CMI para cada extracto de té verde sobre los diferentes cultivos bacterianos, obteniendo el valor de 0.08 gr/ml para el extracto comercial y a granel frente a las cepas del *Streptococcus mutans* y valores de 0.08 gr/ml y de 0.25 gr/ml frente al *Streptococcus sanguinis* respectivamente. Estos resultados muestran que se necesita una concentración mucho menor de nuestros extractos para inhibir a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* con respecto al trabajo presentado por Tahir y col., donde muestran que el valor de la CMI para *Streptococcus mutans* fue 0.7 mg/ml. [25] No existen reportes en la literatura sobre la CMI del té verde frente a las cepas de *Streptococcus sanguinis*.

Se demostró el efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* frente al *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. A pesar de los resultados presentados, es necesario complementarlo posteriormente con estudios de citotoxicidad para finalmente obtener un producto natural que no sea perjudicial para el ser humano pero que pueda ser utilizado

como un complemento a la higiene oral que contribuya notablemente a la población peruana, ya que de no ser tóxico, se podría propiciar el uso del consumo de té verde tanto como infusión o en otra presentación y así reducir los altos niveles de caries dental, teniendo en cuenta que en nuestro país el 95% de la población presenta esta enfermedad, mediante la inhibición de la bacteria más prevalente en la cavidad oral que presenta alto potencial cariogénico y de la encargada de la producción de placa dental.

Los resultados del presente estudio con el té verde a granel, además del halo de inhibición, mostró crecimiento bacteriano excesivo alrededor de este, a diferencia de los halos obtenidos por el té verde comercial que no evidencian crecimiento bacteriano, esto indica que aunque ambos productos son hojas de té verde, es necesario asegurar la pureza y composición del producto a utilizar. Por este motivo se recomienda para estudios futuros, caracterizar la composición de los productos utilizados mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

Se concluye que este tipo de investigación es de suma importancia ya que ofrece una visión más amplia sobre la fitoterapia y su uso en el campo de la Odontología. Por estudios etnobotánicos se sabe que existen muchas plantas que tienen actividades antimicrobianas, por tal motivo se sugiere realizar estudios de plantas nativas sobre bacterias orales para así tener otros recursos con los que se puede lidiar frente a enfermedades que afectan a la cavidad oral, con costos reducidos y sobre todo de manera natural, favoreciendo el bienestar de la población.

IX. CONCLUSIONES

1. El promedio del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto metanólico (marca comercial) de *Camellia sinensis* fue de 19.72 mm. , mientras que, el extracto en base a té verde a granel tuvo una media de 18.1 mm. frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Por otro lado el promedio del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto metanólico de marca comercial fue de 17.94 mm, mientras que, el extracto en base a té verde a granel tuvo una media de 16.46 mm. frente al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

2. La concentración mínima inhibitoria para el extracto metanólico de té verde comercial y a granel frente a cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fue de 0.08 gr/ml. En el caso del *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) la CMI para el extracto metanólico de té verde comercial fue de 0.08 gr/ml y para el té verde a granel de fue 0.25 gr/ml.

3. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los dos extractos metanólicos de té verde frente a ambas bacterias. El extracto metanólico del té verde comercial fue el que presentó un mayor efecto antibacteriano frente al extracto a granel contra las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo García E, Martínez Solís I. Manual de Fitoterapia. 1ª ed. Madrid: Elsevier; 2007.

2. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.

3. Page W. Caufield. y col. Natural History of *Streptococcus sanguinis* in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. Infect. Immun. 2000; 68(7): 4018-23.

4. Moromi H, Martinez E, Ramos D. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Odontol. Sanmarquina. 2009; 12(1): 25-8.

5. Moromi H, Martinez C. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Odontol. Sanmarquina. 2006; 9(2): 23-4.

6. Niños peruanos tienen la tasa más alta en incidencia de caries en América Latina. La República. 06 de Setiembre de 2012.

7. Salud Bucal [Sed Web]*. Perú: Minsa [acceso 19 de junio de 2013]. Disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm

8. Fernández K, García C. Efectividad antibacteriana *in vitro* de una Solución a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* frente a flora Salival mixta en pacientes ortodónticos [tesis de bachiller]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2009.

9. Té verde [Sed Web]*. USA: Medline [acceso 24 de octubre de 2012]. Disponible en: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/960.html

10. Namita P, Mukesh R, Vijay K. *Camellia Sinensis* (Green Tea): A Review. Global J. Pharmacol. 2012; 6 (2): 52-9.

11. Moromi H. Efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Camellia Sinensis* sobre bacterias orales. Odontol. Sanmarquina. 2007; 10(1): 12-4.

12. Jalayer N, Niakan M, Kharazi M, Zardi S. Antibacterial Activity of Iranian Green and Black Tea on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* Study. J Dent (Tehran). 2011; 8(2): 55-9.

13. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. J Am Coll Nutr. 2006; 25(2): 79–99.

14. Ogle N. Green tea *Camellia sinensis*. Aust J Med Herbal. 2009; 21(2): 44-8.

15. Goenka P, Sarawgi A, Karun V, Nigam A, Dutta S, Marwah N. *Camellia sinensis* (Tea): Implications and role in preventing dental decay. Pharmacogn Rev. 2013; 7(14): 152–6.

16. Sharangi A. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. Food Res Int. 2009; 42(5): 529–35.

17. Arab H. y col. A Review of The therapeutic effects of *Camellia sinensis* (green tea) on oral and periodontal health. J. Med. Plants. Res. 2011; 5(23): 5465-9.

18. Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. Arch Pharm Res. 1998; 21(3): 348-52.

19. Hassani AS, Amirmozafari N, Ordouzadeh N, Hamdi K, Nazari R, Ghaemi A. Volatile components of *Camellia sinensis* inhibit growth and biofilm formation of oral streptococci *in vitro*. Pak J Biol Sci. 2008; 11(10): 1336-41.

20. Tzung-Hsun T, Tsung-Hsien T, You-Chia Ch, Chi-Wei L, Po-Jung T. *in vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. Food Chem. 2008; 110(4): 859-64.

21. Paredes N. Efectividad antibacteriana *in vitro* de una solución a base de *Camellia sinensis y Minthostachys mollis* frente a flora salival mixta en pacientes ortodónticos [tesis de bachiller]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.

22. Alvarado V, Moromi H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major L, Erythroxylum novogranatense, Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. Odontol. Sanmarquina 2010; 13(2): 21-5.

23. Sarmiento L. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico y del extracto acuoso de Té verde (*Camellia Sinensis*) sobre bacterias orales de Importancia Estomatológica, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus Mitis* y *Streptococcus* salivarius [tesis de bachiller]. Lima: Universidad Alas Peruanas; 2010.

24. Hamidreza A. y col. Review of The therapeutic effects of *Camellia sinensis* (green tea) on oral and periodontal health. J. Med. Plants Res. 2011; 5(23): 5465-9.

25. Tahir A, Moeen R. Comparison of antibacterial activity of water and ethanol extracts of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze against dental caries and detection of antibacterial components. J. Med. Plants Res. 2011; 5(18): 4504-10.

26. Hajenorouzali M, Asghari G, Hajiahmadi M. Comparing *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* colony countchanges following green tea mouth rinse or sodium fluoride mouth rinse use in children (Randomized double-blind controlled clinical trial). Dental Research Journal. 2011; 8(5): 58-63.

27. Salazar M. Evaluación del efecto citotóxico del Té de Rutilo, *in vitro*. Instituto de investigaciones farmacéuticas. 2011.

28. Jigisha A, Nishant R, Navin K, Pankaj G. Green tea: A magical herb with miraculous outcomes. IRJP. 2012; 3(5): 139-48.

29. Arencibia D, Rosario L, Curveco D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel. 2009; (19): 40-51.

30. Rodríguez Cavallini E, Gamboa Coronado M, Hernández Chavarría F, García Hidalgo J. Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.

31. Axelrod M, Berkowitz S, Dhir R, Gould V, Gupta A, Li E y col. The inhibitory effects of green tea (*Camellia sinensis*) on the growth and proliferation of oral bacteria. 2010:1-17.

32. Jae-Kwan H, Jae-Seok S, Jae-Youn Ch. Anticariogenic activity of some tropical medicinal plants against *Streptococcus mutans*. Fitoterapia. 2004; 75(6): 596-8.

33. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem AC, Oliveira MA, Soares CP, Freitas LS y col. Systematic Screening of Plant Extracts from the Brazilian Pantanal with Antimicrobial Activity against Bacteria with Cariogenic Relevance. Caries Res. 2014; 48(5): 353-60.

34. Chava VR, Manjunath SM, Rajanikanth AV, Sridevi N. The efficacy of neem extract on four microorganisms responsible for causing dental caries viz Streptococcus mutans, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis*: an *in vitro* study. J Contemp Dent Pract. 2012; 13(6): 769-72.

35. Costa L, Gouveia S, Nóbrega J. Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg and Mn in tea samples. Anal Sci. 2002; 18(3): 313-8.

36. Lolayekar N.y Shanbhag C. Polyphenols and oral health. RSBO. 2012; 9(1): 74-84.

37. Hamilton J. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J Med. Microbiol. 2001; 50(4): 299-302.

GLOSARIO

- ºC: Grados centígrados.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- *Camellia sinensis*: Nombre científico del té verde.
- Caries dental: Enfermedad multifactorial caracterizada por la destrucción de los tejidos dentales como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana.
- Clorhexidina: Sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida.
- Concentración mínima inhibitoria (CMI): Concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo.
- Efectividad antibacteriana: Inhibición en el desarrollo o crecimiento de las bacterias por la presencia de alguna sustancia.
- Fitoterapia: Ciencia encargada del estudio de la utilización de plantas con finalidades terapéuticas.
- Halos de inhibición: Es lo que nos indica la sensibilidad del microorganismo ante un antibiótico.
- IIN: Instituto de Investigación Nutricional.
- *in vitro*: técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
- Método de difusión en agar con discos: Procedimiento empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico.

- mm: milímetros.
- *Streptococcus mutans*: Bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, responsable de la formación de Caries Dental.
- *Streptococcus sanguinis*: Bacteria perteneciente a la familia de *Streptococcaceae* y se encarga de la producción de placa dental.
- TSA: Trypticase Soy Agar.
- UPC: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.

ANEXOS

ANEXO 1

Determinación del tamaño de muestra

ESTIMACIÓN DE MEDIAS

```
. sampsi 18.1 16.6, sd1(1.84) alpha(0.05) power(.80) onesample

Estimated sample size for one-sample comparison of mean
  to hypothesized value

Test Ho: m =   18.1, where m is the mean in the population

Assumptions:

         alpha =   0.0500  (two-sided)
         power =   0.8000
 alternative m =     16.6
            sd =     1.84

Estimated required sample size:

             n =       12

.
```

ANEXO 2

Obtención de las cepas bacterianas

Fig. 1. Cepas bacterianas obtenidas de manera comercial (GenLab del Perú S.A.C)

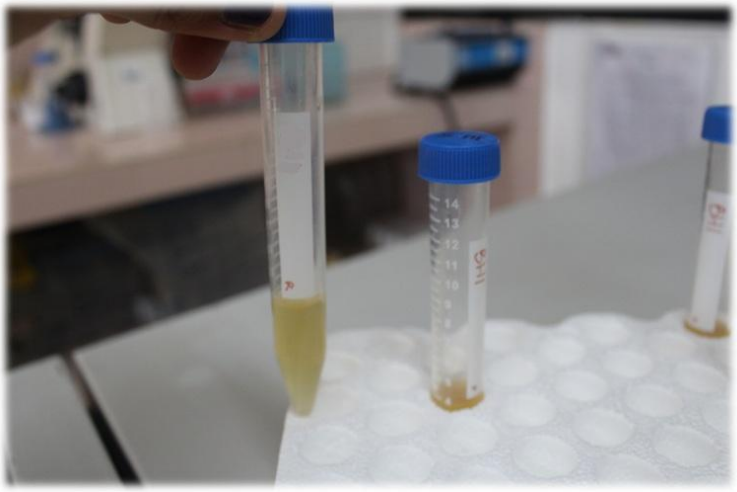


Fig. 2. Cultivo bacteriano

ANEXO 3

Obtención de la muestra

Fig. 1. Producto Comercial: Té verde Renacer ®

Fig. 2. Producto a granel: Té verde adquirido en Calle Capón

ANEXO 4

Extracto metanólico a partir de *Camellia sinensis* liofilizado

Fig. 1. Macerar 57 gramos de *Camellia sinensis* en 172 ml de metanol puro

Fig. 2. Filtración en papel Wathman N°4

Fig. 3. Extracto de té verde

Fig.4. Evaporación del metanol

ANEXO 5

Efecto antibacteriano

Preparación del agar Trypticase Soy Agar

Fig. 1. Agar TSA

Fig. 2. Pesar la cantidad del agar por usar (10 gr)

Fig. 3. 10 gramos de agar TSA

Fig. 4. Mezclar 10 gramos de agar TSA con 250 ml de agua destilada

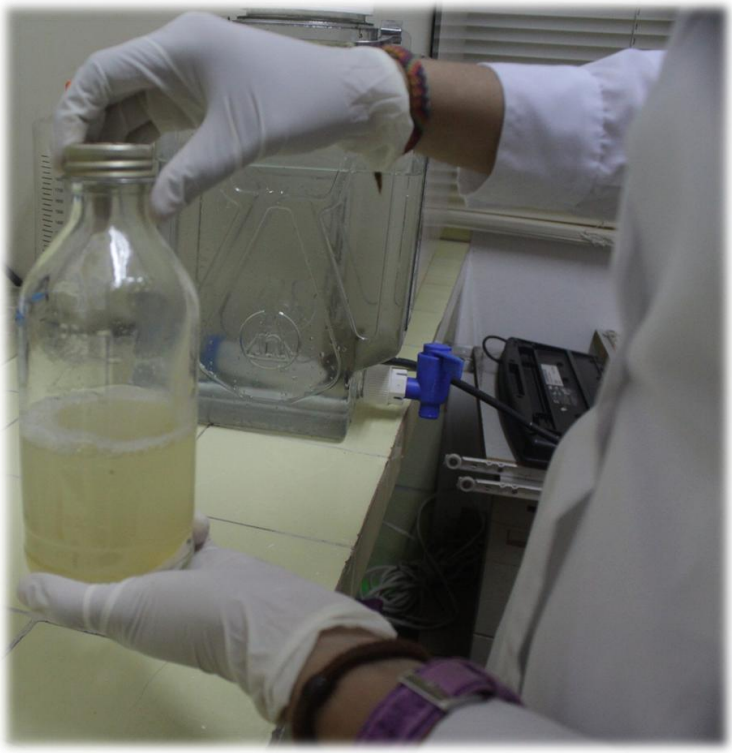


Fig. 5. Homogeneizar el contenido

Fig. 6. Autoclavar por 20 minutos

Preparación de las placas Petri

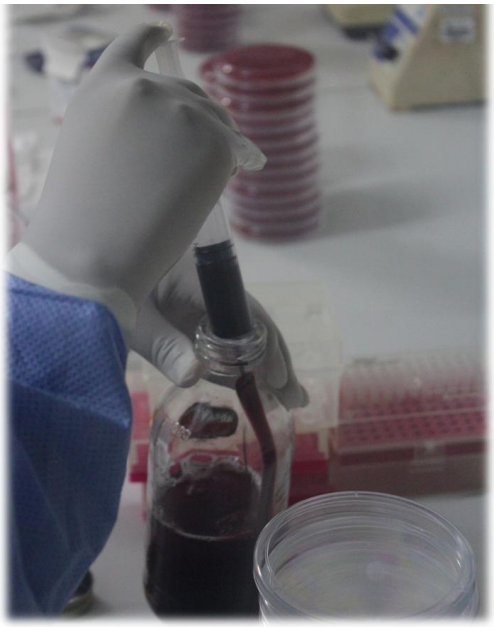


Fig. 1. Se combina la sangre de cordero desfibrinada (50 ml) con el agar TSA. Homogeneizar el contenido

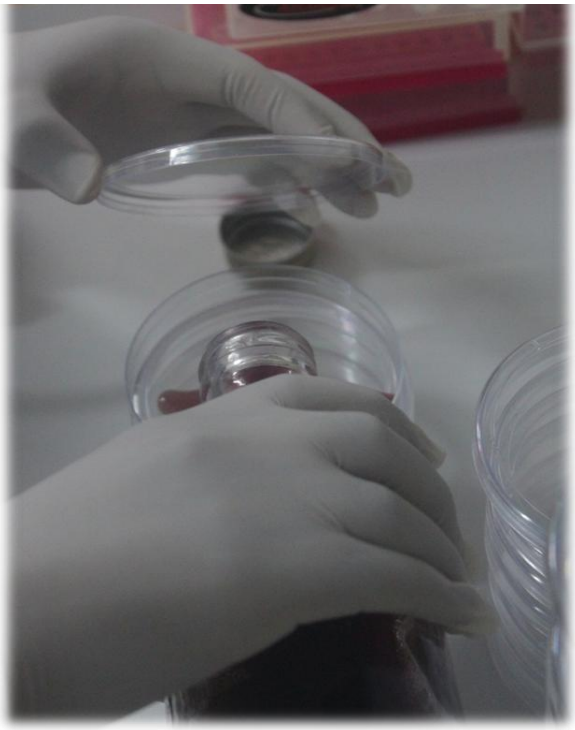


Fig. 2. Verter el contenido en las placas Petri, con cuidado de no generar burbujas

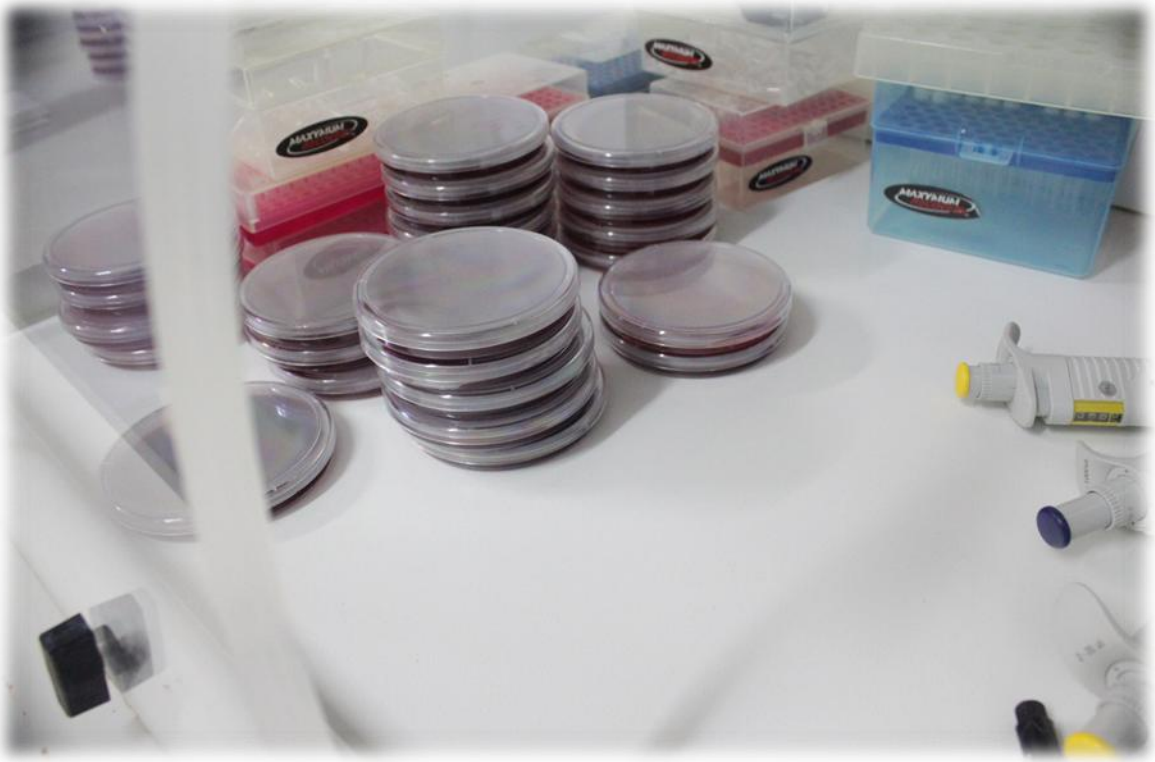
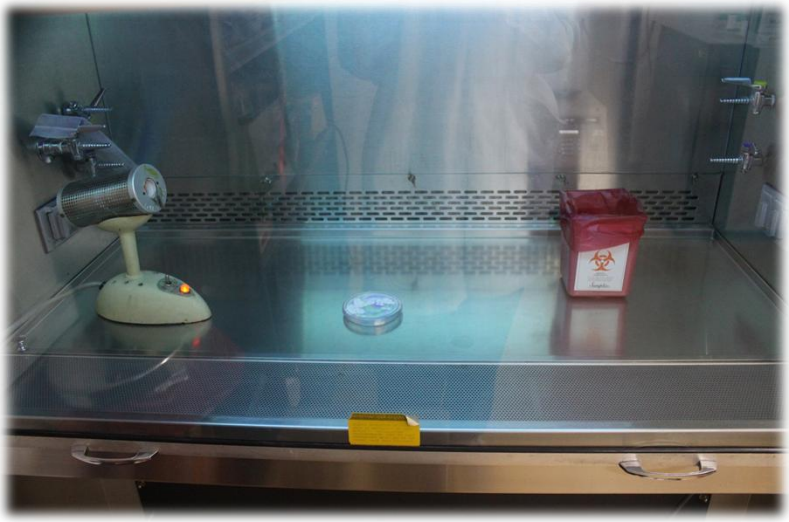


Fig. 3. Realizar el mismo procedimiento para todas las placas Petri y esperar a que el medio solidifique

Método de difusión en discos



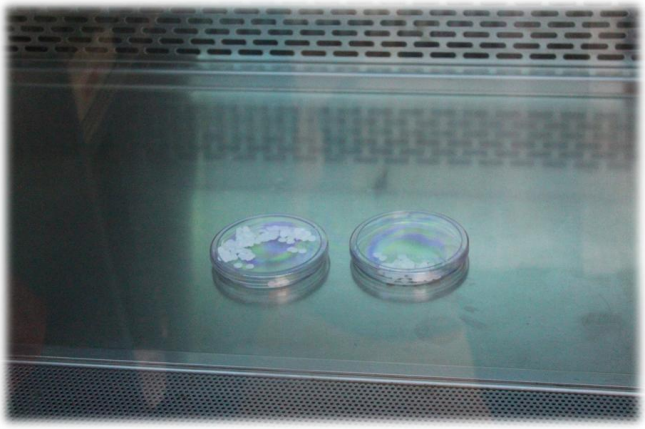


Fig. 1. Se preparan discos de papel Wathman de 6 mm de diámetro que deben ser uveados por 15 minutos

Fig. 2. Pipetear 200 µl de cada cepa y sembrarla en cada placa petri

Fig. 3. Impregnar cada disco con 30 µl del extracto metanólico

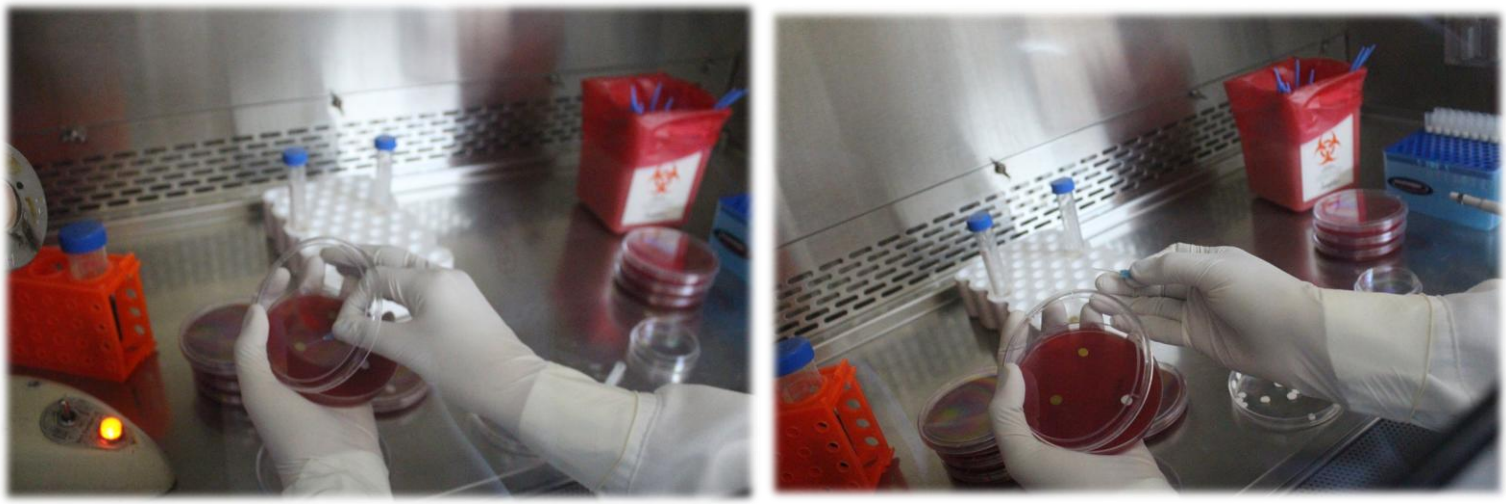


Fig. 4. Sobreponer cada disco de papel Wathman sobre las placas previamente cultivadas

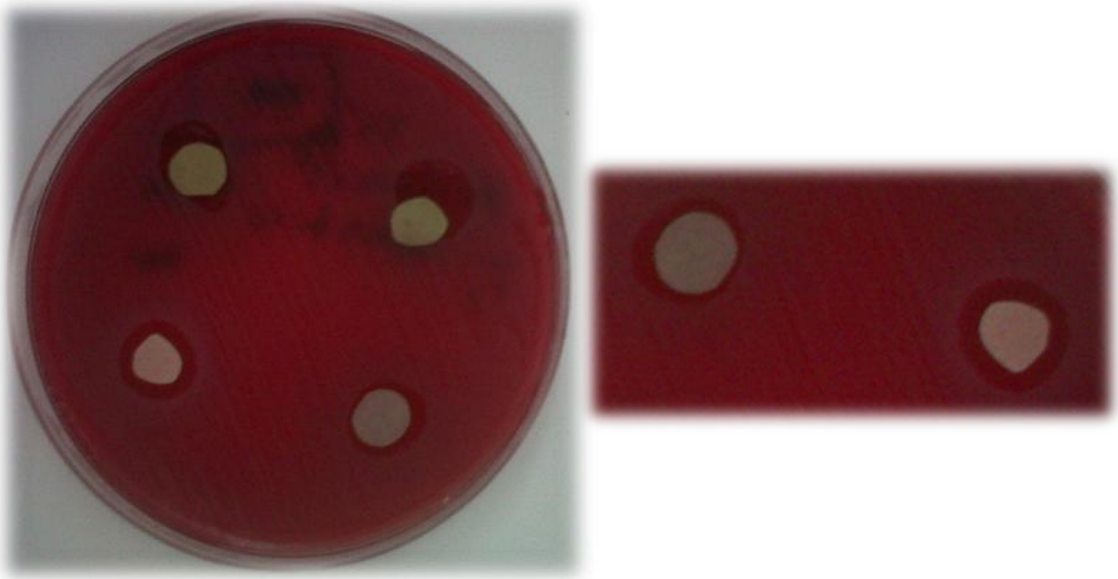
Fig. 5. Al finalizar el procedimiento, se colocan todas las placas en la cámara de anaerobiosis por un período de 72 horas

.

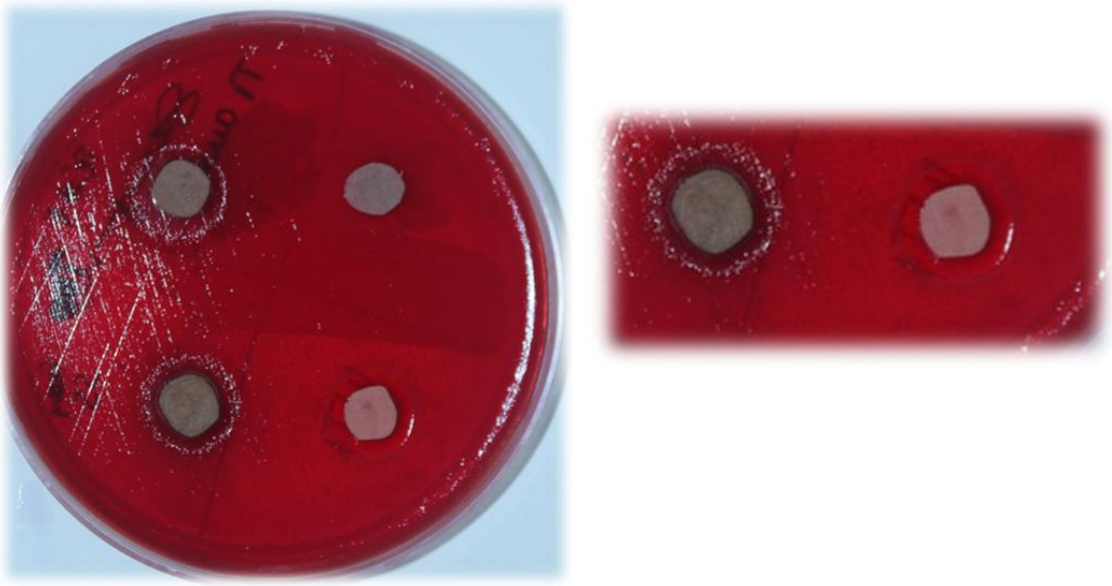
ANEXO 6

Halos de inhibición del extracto metanólico de té verde comercial

S. mutans



S. sanguinis



Halos de inhibición del extracto metanólico de té verde a granel

S. Mutans

S. Sanguinis