

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

**ESCUELA DE ESTOMATOLOGÍA**



**EFFECTO SINERGICO *IN VITRO* DEL *ORIGANUM VULGARE* Y LA  
PENICILINA SOBRE LA RESISTENCIA DEL *ENTEROCOCCUS*  
*FAECALIS* ATCC 29212.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA**

**AUTOR: Mario Ernesto Malca Becerra.**

**ASESORA: Dra. María Espinoza Salcedo.**

**COASESORA: Dra. Elva Mejía Delgado.**

**Trujillo – Perú**

**2016**

## DEDICATORIA

A Dios cuya presencia me acompaña en cada momento de mi vida.

A mis padres y hermana por el apoyo ofrecido en todo momento.

A mis abuelos que desde algún lugar me acompañan siempre.

A mi sobrina Zoe por generar amor en mi familia.

Mario.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora Dra. María Victoria Espinoza Salcedo, por su apoyo y dedicación para el desarrollo y realización del presente estudio

A mi coasesora Dra. Elva Mejía Delgado por brindarme las facilidades para la ejecución del presente estudio.

Al personal que labora en el área de microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo por brindarme su ayuda.

El autor.

# ÍNDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
I. PLAN DE INVESTIGACIÓN.....	1
A. DEL PROBLEMA .....	1
1. FUNDAMENTO TEORICO: .....	1
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	6
3. HIPÓTESIS.....	6
4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	6
B. DEL DISEÑO DE METODOLÓGICO:.....	7
1. MATERIAL DE ESTUDIO.....	7
2. MÉTODOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	10
3. ANALISIS ESTADISTICO DE LA INFORMACION.....	15
RESULTADOS .....	16
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES .....	22
RECOMENDACIONES .....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
ANEXOS.....	30
ANEXO 1 .....	31
ANEXO 2 .....	32

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como propósito determinar el efecto sinérgico in vitro de *Origanum vulgare* y la penicilina sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Se obtuvieron 10 ml. De aceite esencial, mediante el proceso denominado destilación por arrastre de vapor de agua. La cepa se obtuvo de la sección de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo.

Para la determinación del efecto sinérgico mediante la técnica de Kirby y Bauer; se prepararon discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada concentración del aceite esencial de orégano: 75%, 100%, mezclada en partes iguales con la penicilina. Posteriormente fueron colocados en placas Petri conteniendo cultivos de microorganismos ; obteniendo como resultado que los grupos de discos embebidos con aceite esencial de orégano al 100% y el grupo de aceite esencial de orégano +penicilina tuvieron mayor promedio.

Para la concentración mínima inhibitoria se emplearon concentraciones del aceite esencial de orégano de 75%, 100%, mezclada en partes iguales con la penicilina y para la Concentración Mínima Inhibitoria se prepararon 4 tubos de ensayo para cada concentración de 75% y 100%.

Se formaron 6 grupos de 10 placas petri cada uno; grupo I (aceites esencial a 75%), grupo II (aceite esencial al 100%), grupo III (aceite esencial al 75% + penicilina), grupo IV (aceite esencial al 100% + penicilina), grupo V (bacteria sola), grupo VI (penicilina sola). Observándose crecimiento sólo en el grupo V.

Se empleó el análisis estadístico ANOVA donde se determinó el diámetro promedio de halos de inhibición y las unidades formadoras de colonias según grupos de investigación. La prueba Duncan permitió evidenciar la existencia de 4 grupos estadísticamente diferentes entre sí.

Concluyendo que el aceite esencial de *Origanum vulgare* posee efecto antimicrobiano in vitro sobre cepas de *Enterococcus faecalis* Atcc29212 además de sinergismo con la penicilina.

**Palabras Clave:** Origanum vulgare, Aceite esencial, Enterococcus faecalis, Efecto sinérgico.

## ABSTRACT

The present study aimed to determine the in vitro synergistic effect of *Origanum vulgare* and penicillin on the resistance of *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. 10 ml was obtained. Of essential oil, by means of the process denominated distillation by drag of steam of water. The strain was obtained from the microbiology section of the National University of Trujillo.

For the determination of the synergistic effect by the technique of Kirby and Bauer; Sterile filter paper discs were prepared, which were submerged within each concentration of oregano essential oil: 75%, 100%, mixed equally with penicillin. Subsequently they were placed in Petri dishes containing cultures of microorganisms; With the result that the groups of disks imbued with 100% oregano essential oil and the essential oil group of oregano + penicillin had a higher average.

Concentrations of the 75%, 100%, oregano essential oil, mixed in equal parts with penicillin, were used for the minimum inhibitory concentration and for the Minimum Inhibitory Concentration, 4 test tubes were prepared for each concentration of 75% and 100%.

6 groups of 10 petri dishes each were formed; Group I (75% essential oils), group II (100% essential oil), group III (75% essential oil + penicillin), group IV (100% essential oil + penicillin), group V , Group VI (penicillin alone). Observing growth only in group V.

Statistical analysis was used ANOVA where the average diameter of inhibition halos and halos of colony forming units were determined according to research groups. By means of the Duncan test that allows to evidence the existence of 4 groups statistically different from each other.

Concluding that the oil essences of *Origanum vulgare* possesses antimicrobial effect in vitro on strains of *Enterococcus faecalis* Atcc29212 in addition to synergism with penicillin.

Key words: *Origanum Vulgare*, Essential oil, *Enterococcus faecalis*, Synergistic effect.

## I. PLAN DE INVESTIGACIÓN

### A. DEL PROBLEMA

#### 1. FUNDAMENTO TEORICO:

Durante el tratamiento de conductos radiculares el objetivo de la preparación biomecánica es limpiar y modelar adecuadamente el conducto radicular antes de la obturación. Sin embargo, en muchos casos donde se realiza una necropulpectomía los conductos radiculares muestran bacterias aún después de una meticulosa preparación quirúrgica de conductos radiculares<sup>1</sup>. Estos microorganismos conducen al fracaso del tratamiento endodóntico, con frecuencia presentan bacterias facultativas Gram-positivas que incluyen *Enterococos*, *Streptococos* y *Lactobacilos*, que originan una periodontitis apical persistente<sup>2</sup>.

Diversos estudios han revelado que la microbiota de los dientes con fallas en el tratamiento endodóntico difieren de la microbiota encontrada normalmente en los conductos de dientes no tratados<sup>3-6</sup>. La microbiota que se encuentra en los dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico es predominantemente anaerobia facultativa y Gram positiva, siendo el *Enterococcus faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia<sup>7</sup>.

Una característica notable de esta especie es su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias, entre estos en presencia de Hidróxido de Calcio<sup>8</sup>. Su erradicación del conducto radicular es difícil utilizando preparaciones químico-mecánicas e irrigantes como desinfectantes, así como pastas y sustancias antibacterianas<sup>9</sup>.

Los enterococos, particularmente *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal tanto humano como animal y del tracto genitourinario femenino humano. En la última década, estos organismos han adquirido cada vez más importancia

como patógenos nosocomiales, a pesar de su baja virulencia. El género *Enterococcus* tiene ciertas características que les facilita la diseminación entre los pacientes hospitalizados: puede colonizar el tracto gastrointestinal de los trabajadores de la salud y de los pacientes, proveyendo un reservorio continuo para la diseminación intrahospitalaria; es resistente a varios antibacterianos de uso frecuente; la resistencia antimicrobiana le permite su supervivencia en un medio ambiente con alto uso de antibacterianos; puede contaminar el medio ambiente hospitalario y sobrevivir en él por períodos prolongados; puede contaminar las manos de los trabajadores de la salud, permaneciendo por más tiempo si los empleados no cumplen con las normas de lavado de manos<sup>10</sup>.

El *Origanum vulgare* "Orégano" es una planta muy versátil y aunque se ha conocido durante mucho tiempo, como un recurso popular, recientemente se le ha reconocido por su potencial papel terapéutico como diaforético, carminativo, antiespasmódico, antiséptico, antioxidante y otras propiedades. El Orégano, ha demostrado inhibir el crecimiento de varias bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, también ha demostrado tener un efecto inhibitorio contra los hongos transmitidas por los alimentos<sup>11</sup>.

Más de Cuarenta y ocho componentes fueron identificados en el Orégano, que representan el 98,59% de los aceites esenciales. Los elementos como el Carvacrol, Timol, Terpinen-4-ol, Linalol, Sabineno,  $\alpha$ -Terpineno, y  $\gamma$ -Terpineno se encontraron como los principales componentes, los cuales tienen un perfil antimicrobiano. El Carvacrol, uno de los elementos del Orégano, es un potente inhibidor del crecimiento de las células en la línea celular A549, esto le permite actuar como anticancerígeno<sup>12</sup>.

El aceite de orégano y sus principales componentes fenólicos, el Carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil) fenol] y Timol (2-isopropil-5-metilfenol), son conocidos por su amplio espectro de actividad antimicrobiana, varias investigaciones mostraron considerables efectos inhibitorios contra organismos en prueba in vitro,<sup>13,14</sup> también ha sido probado en ratas infectadas experimentalmente dado resultados prometedores<sup>13</sup>. Poseen múltiples propiedades biológicas



tales como anti-inflamatorios, anti-leishmanial, antioxidante, hepatoprotector y las actividades anti-tumoral<sup>14,15</sup>. La mezcla de Carvacrol y el Timol en cantidades adecuadas pueden ejercer la inhibición bacteriana total, que es evidente en el aceite esencial de Orégano. Esta inhibición se debe a daños en la integridad de la membrana, lo que más afecta a la homeostasis del pH y el equilibrio de los iones inorgánicos<sup>16,17,18</sup>.

Los aceites esenciales de *Origanum vulgare* también exhiben propiedades antifúngicas frente a los patógenos humanos *Malassezia*, *Trichophyton rubrum* y *beigelii Trichosporon*<sup>19</sup>. Los aceites esenciales, derivados del Orégano presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; además de las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*<sup>20</sup>.

Los componentes como el Carvacrol, Timol, Eugenol, Perillaldehyde, Cinnamaldehyde y Ácido cinnámico, del Orégano, son eficaces como antimicrobianos, teniendo su concentración inhibidora mínima (CIM), de 0.05-0.5 µl/ml in Vitro<sup>21</sup>.

La actividad antimicrobiana de Aceite de Orégano, se atribuye principalmente a la acción de sus principales componentes fenólicos, como son el Carvacrol y el Timol, que muestra gran actividad bactericida<sup>22</sup>. Debido a su carácter hidrofóbico, el Carvacrol y el Timol interactúan con los lípidos de la membrana citoplásmica causando la pérdida de la integridad y la pérdida de material celular tales como los Iones, ATP y Ácidos Nucleicos; por lo tanto, el Carvacrol y el Timol, solos o en aceite de orégano, podría difundirse a través de la matriz de polisacáridos del biofilm y desestabilizarlo debido a sus fuertes propiedades antimicrobianas intrínsecas<sup>23</sup>.

En los dientes con pulpa mortificada o necrótica, el contenido microbiano tóxico de la cavidad pulpar determina la opción por sustancias antisépticas. La medicación intraconducto será entonces un auxiliar valioso en la desinfección del sistema de conductos radiculares, sobre todo en lugares

inaccesibles a la instrumentación, como las ramificaciones del conducto principal y túbulos dentinarios. La elección de una medicación intraconducto entre sesiones requiere de las mismas consideraciones que la aplicación de cualquier fármaco en otra región del organismo humano. Por lo tanto es necesario considerar: Cantidad, localización y tiempo de aplicación<sup>23</sup>.

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas primitivas en el tratamiento de enfermedades. Durante mucho tiempo los fármacos naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de especies vegetales con propiedades medicinales y que se ampliara la investigación a cerca de los productos que de ellas se extraen<sup>24</sup>. Nuestro país está considerado entre los 12 países de mayor diversidad biológica de la tierra, conocidos como países megadiversos tanto por el número de especies y de recursos genéticos como por la variedad de ecosistemas<sup>25</sup>.

Las Penicilinas son empleadas con gran frecuencia por su eficacia terapéutica y escasa toxicidad. Dentro de las acciones indeseables, se cuentan las reacciones de hipersensibilidad que son los efectos adversos más comunes, éstos pueden producir fiebre, asma, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica, neutropenia, pancitopenia y vasculitis, las más frecuentes son las cutáneas (urticarias). En ocasiones puede haber *shock* anafiláctico, muchas veces mortal<sup>26</sup>.

La penicililina ha sido por mucho tiempo una de las principales armas terapéuticas en el tratamiento de infecciones dentales. Las carboxi y ureido penicilinas son activos contra *Pseudomona aeruginosa* y Gram negativos intrahospitalarios<sup>27</sup>.

Aunque la penicilina es activa contra los estreptococos y todos los anaerobios no productores de B-Lactamasas, no provee buena cobertura para anaerobios gram negativos productores de B-Lactamasas. Más de la mitad de bacilos anaerobios gram negativos que son prevalentes en infecciones orofaciales han demostrado incremento de resistencia a la

penicilina por producción de B-Lactamasas. Estos incluyen *Fusobacterium* spp, *Prevotella* y *Porphyromonas* spp<sup>27</sup>.

En la cirugía dental se produce frecuentemente bacteremia, la administración profiláctica de penicilina reduce este riesgo y es muy necesario en pacientes que tienen prótesis valvulares para prevenirla endocarditis. También se recomienda en pacientes con prótesis articulares previamente a ser sometidos a exodoncias u otros procedimientos de cirugía dental<sup>27</sup>.

Elaite et al. (2011) evaluaron la actividad del aceite esencial de orégano frente a levaduras aisladas, causantes de patologías orales. En este estudio se hizo evidente la gran actividad fungicida que presenta el aceite de orégano ya que en el estudio in vitro se evidencio claramente los halos de inhibición formados<sup>28</sup>.

Palacios y col. (2004) evaluaron la capacidad bactericida in vitro de preparados a base de *Minthostachys mollis* y agua destilada a varias concentraciones (2, 4, 6 y 8 gr), frente a *Streptococcus* orales. Encontraron muy poca efectividad antibacteriana<sup>29</sup>.

Albado et al. (2001) determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) frente a cepas patógenas referenciales como el *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella cholerae*, *Salmonella tiphymurium* y *Pseudomonas aeruginosa*; se concluye que el aceite esencial posee activiad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto frente a la *P. aeruginosa*<sup>30</sup>.

Thompson refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química – principio activo – que produce un efecto fisiológico.

## JUSTIFICACION

De obtener el efecto sinérgico del aceite de *Origanum vulgare* y penicilina sobre el crecimiento de cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, se abrirá una puerta de posibilidades en la terapéutica de piezas dentarias con necrosis pulpar, ya que podría reducir los fracasos endodónticos ocasionados por infecciones persistentes y que evitará la exposición local y sistémica a sustancias tóxicas como tratamiento, ya que esta solución podría constituirse en una alternativa de origen natural para la medicación intraconducto.

Por lo tanto el propósito del presente estudio, es determinar el efecto sinérgico del *Origanum vulgare* y penicilina sobre el *Enterococcus faecalis*

### 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe efecto sinérgico *in vitro* del *Origanum vulgare* y penicilina sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

### 3. HIPÓTESIS

Si existe efecto sinérgico *in vitro* del *Origanum vulgare* y penicilina sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### 4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto sinérgico *in vitro* del *Origanum vulgare* con penicilina sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis*.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración del *Origanum vulgare* de mejor efecto cuando se une con penicilina sobre las cepas de *Enterococcus faecalis*.
- Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Enterococcus faecalis* por el efecto sinérgico de *Origanum vulgare* con penicilina.

### B. DEL DISEÑO DE METODOLÓGICO:

#### 1. Material de estudio

##### 1.1 Tipo de estudio:

El presente estudio corresponde a un diseño Experimental.

En relación al periodo de captación de la información	En relación a la captación del fenómeno en estudio	En función de la comparación entre poblaciones	En función de la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza.
Prospectivo	Transversal	Comparativo	Experimental

##### 1.2 Área de estudio.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

##### 1.3. Definición de la población muestral

###### 1.3.1 Características generales:

- Conjunto de tubos de ensayo conteniendo la macrodilución en solución salina del microorganismo de prueba:

*Enterococcus faecalis* y la concentración de aceite esencial de *Origanum vulgare* correspondiente.

- Conjuntos de placa Petri con agar Mueller Hinton conteniendo la macrodilución en solución salina del microorganismo de prueba: *Enterococcus faecalis* y la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* correspondiente.

#### **1.3.1.1 Criterios de inclusión:**

- Tubo de ensayo conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* en solución salina estéril con la dilución en base a las concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare* en estudio.
- Placa petri con agar Mueller Hinton conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* en solución salina estéril con la dilución en base a las concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* en estudio.

#### **1.3.1.2 Criterios de exclusión:**

- Tubo de ensayo conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Tubo de ensayo conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* cuyo resultado en el proceso de incubación sea dudoso.
- Placa petri con agar Mueller Hinton conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Placa petri con agar Mueller Hinton conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* que

presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.

#### **1.3.1.3 Criterios de eliminación:**

- Tubo de ensayo conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* que haya sufrido contaminación o deterioro durante la realización de procedimientos y que no permita su medición posterior.
- Placa petri con agar Mueller Hinton conteniendo la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* que haya sufrido contaminación o deterioro durante la realización de procedimientos y que no permita su medición posterior.

### **1.3.2 Diseño estadístico de muestreo:**

#### **1.3.2.1 Unidad de análisis**

La unidad de análisis la constituyeron los halos de inhibición producto del efecto sinérgico del *Origanum vulgare* con penicilina sobre las cepas de *Enterococcus faecalis*.

#### **1.3.2.2 Unidad de muestreo**

Unidades formadoras de colonias de tres cepas de *Enterococcus faecalis*, producto del efecto sinérgico del *Origanum vulgare* con penicilina.

#### **1.3.2.3 Población Muestral**

Estuvo constituida por cultivos de *Enterococcus faecalis*, obtenidos en el laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

#### 1.3.2.4 Tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de la muestra se usó de la siguiente fórmula para calcular en número de halos:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * 2\sigma_{\delta}^2}{\delta^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ ; que es un coeficiente de confianza del 95%

$Z_{\beta} = 0.84$ ; que es un coeficiente en la distribución normal para una potencia de prueba del 80%

$\delta = 1.25\sigma_{\delta}$

Luego Reemplazando:

$$n = 10$$

Es decir, se necesitarán aproximadamente 10 muestras como mínimo por cada grupo experimental.

#### 1.3.3 Método de selección

No probabilístico

## 2. Métodos, Técnicas e Instrumento de recolección de datos.:

1.1 **Método:** Observacional.

1.2 **Técnica – Obtención de cepas.**



1. las cepas se obtuvieron del laboratorio de microbiología de la UNT (autorizado por la Dirección de Microbiología).
2. Se utilizó el medio tioglicolato para reactivar las bacterias.
3. Incubación de las cepas por 24 horas a 37° C en microanaerobiosis.
4. Dilución de las bacterias hasta obtener una concentración semejante al tubo 0,5 de la escala de Mac Farlan.

#### **Obtención de aceite esencial**

1. Dos kilos de hojas de *Origanum vulgare* se cortaron en pequeños trozos y se secarán a temperatura ambiente por una semana.
2. Se tomarán 50gr de éstas hojas secas y se procederá a hacer la extracción haciendo uso de un equipo de destilación por arrastre de vapor.
3. Luego se extraerá el aceite trasvasándolo a un frasco estéril color ámbar para su almacenamiento y uso posterior.

### **1.3 Descripción del Procedimiento**

#### **- Inoculación de las placas**

- 1º Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido. Este procedimiento elimina el exceso de líquido del hisopo.
- 2º Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- 3º La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el

exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antibiótico.

#### **Técnica de Kirby y Bauer:**

Se prepararon discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada concentración del aceite esencial de orégano: 75%, 100%, mezclada en partes iguales con la penicilina por el periodo no menor de 1 hora, luego con una aguja estéril, éstos se colocaron sobre los cultivos de los microorganismos en las placas petri previamente preparadas; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 5 minutos.

Después de este tiempo las placas se voltearon de posición y se incubaron a 37° C, durante 24 horas en microanaerobiosis. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

La lectura de los resultados, se llevó a cabo después de las 24 horas, mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento del *Enterococcus faecalis*.

#### **Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC).**

1. Se prepararon 4 tubos de ensayo para cada concentración de 75% y 100% , las cuales fueron mezcladas en partes iguales con el aceite esencial de orégano y penicilina; un tubo control solo con penicilina y otro tubo testigo solo con bacterias; se añadieron 0.8 mL de cada concentración, luego se realizó la inoculación de 0,2 mL de la bacteria la cual fue diluida hasta obtener una concentración semejante al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland en cada uno de los tubos experimentales y un mL del cultivo de la bacteria sin tratamiento como control.
2. Luego los tubos fueron incubados a 37 °C por 24 horas en microanaerobiosis utilizando la jarra Gaspak.

3. Posteriormente, se determinaron las unidades formadoras de colonias (cuentas viables) sembrando 0.1mL de solución de cada uno de los tubos en 10 placas con agar Muller Hinton para las bacterias por cada concentración y grupos controles, utilizando el asa de Driglasky para dispersar la muestra; dichas placas se colocaron en la estufa por 24 horas a 37°C en microanaerobiosis, luego de lo cual, se observó el crecimiento del microorganismo mediante el conteo de unidades formadoras de colonias, considerándose como CMI a la menor concentración en la cual no se observe UFC. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero.

Se realizó el conteo de UFC empleando la siguiente formula.

$$UFC= N/4 \times A \times D$$

Donde

N= número de colonias

A=área

D= dilución

### **Determinación de la susceptibilidad**

Mediante la dimensión de halos en *mm* utilizando un calibrador vernier.

Los resultados obtenidos se registraron en las fichas de recolección de datos y se analizaron.

### **De la aprobación del proyecto:**

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para su ejecución, tras la aprobación del proyecto por parte de la Unidad de Investigación de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego.

### **De la autorización para la ejecución:**

Una vez aprobado el proyecto se procedió a solicitar el permiso a la Dirección de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo y se les

explicó la importancia de la presente investigación con el fin de obtener los permisos correspondientes para su ejecución.

### **Del instrumento de recolección de datos.**

Se utilizaron fichas elaboradas específicamente para la investigación (Anexo 1 y 2).

### **Variables**

Variable	Definición Conceptual	Dimensiones	Definición Operacional e indicadores	Tipo de variable		Escala de Medición
				Naturaleza	Función	
<b>Aceite esencial Oorganum Vulgare</b>	Compuesto principal del oregano; planta perteneciente a la familia lamiaceae y originaria del mediterráneo <sup>32</sup>	Cantidad en ml.	(Concentración utilizada) 100% 75%	Cualitativa	Independiente	Nominal
<b>Efecto sinérgico del Orégano con penicilina</b>	Impedimento del desarrollo de microorganismos por el efecto sinérgico <sup>33</sup>	Susceptibilidad de los halos de inhibición.	Escala de Duraffourd diámetro en mm	Cuantitativa	Dependiente	De Razón
		Concentración Mínima Inhibitoria.	Unidades formadoras de colonias por ml.	Cuantitativa		De Razón

### 3. **ANALISIS ESTADISTICO DE LA INFORMACION**

Los datos fueron almacenados en una base de datos EXCEL y procesados en el software estadístico IBM SPSS Statistic.

Los resultados fueron presentados en tablas con medias y desviación estándar, así como en un gráfico.

El análisis estadístico comprendió el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto sinérgico y la concentración mínima inhibitoria.

## RESULTADOS

El presente trabajo de investigación de tipo experimental tuvo como objetivo determinar el efecto sinérgico in vitro del *Origanum vulgare* con penicilina sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis*.

Se emplearon concentraciones de 75% y 100% de aceite esencial de Orégano vulgare.

El efecto sinérgico in vitro evaluado en el diámetro promedio de halos de inhibición según grupos de investigación: grupo I (aceites esencial a 75%), grupo II, (aceite esencial al 100%), grupo III (penicilina sola) grupo IV (aceite esencial al 100% + penicilina), grupo V (aceite esencial al 75% + penicilina). Se observó que el grupo sólo de aceite esencial la concentración que registró el mayor promedio de halo de inhibición siendo la concentración 100.0% (23.0) y en lo que se refiere al grupo penicilina más aceite esencial, el mayor promedio se registró en el grupo Penicilina + Aceite Esencial Origanum Vulgare 100% (21.7), el menor promedio se registró en el grupo tratamiento control (7.0). (Tabla N°1, Grafico N°1)

Entre los grupos de investigación existe diferencias significativas, tanto del grupo control como de los grupos de aceite esencial y penicilina más aceite esencial. Dado que el valor P de la tabla de análisis de varianza es menor que 0.05 ( $p=0.000$ ) se puede decir que los grupos son diferentes entre sí, al menos 1 de ellos es diferente a los demás. (Tabla N°2)

La diferencia entre los grupos de investigación es evidente, al no observarse valores en cada uno de los tratamientos ya sea de aceite esencial o de penicilina más aceite esencial; todos ellos comparados con el tubo control que muestra crecimiento en la unidad de medición. (Tabla N°3)

La prueba de Duncan permite evidenciar la existencia de 4 grupos estadísticamente diferentes entre sí. Los resultados muestran los grupos de investigación ordenados en forma ascendente, es decir los que tuvieron menor diámetro de halo de inhibición a los que tuvieron mayor halo de inhibición. Se

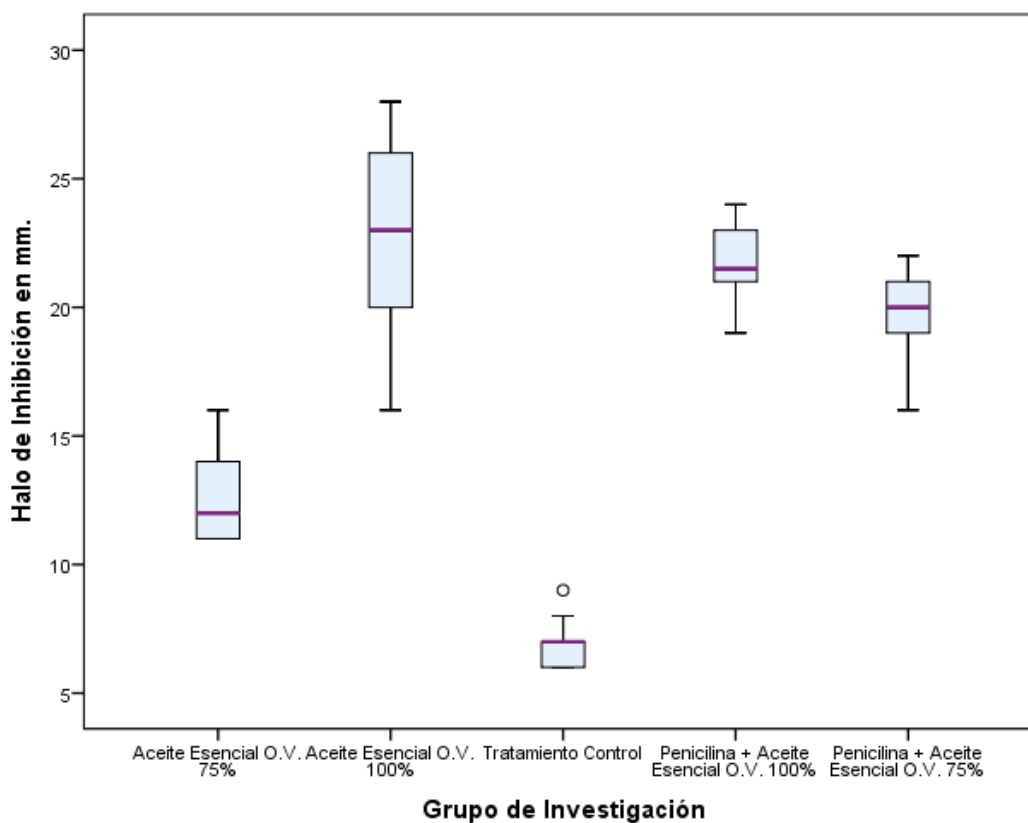
puede decir que son los grupos Penicilina + Aceite Esencial *Origanum vulgare* 100% y Aceite Esencial *Origanum vulgare* 100% son los grupos de investigación que tienen mayor sensibilidad ya que presentan mayor halo de inhibición muestran que los otros grupos de investigación; sin embargo, entre ellos no existe diferencia significativa ya que se encuentran dentro del mismo grupo (G4). (Tabla N°4)

**Tabla N°1:**

**Resumen descriptivo del efecto sinérgico in vitro evaluado en el diámetro promedio de halos de inhibición según grupos de investigación: concentración de aceite esencial de *Origanum vulgare*, tratamiento control y penicilina con concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*.**

<i>Grupo de Investigación</i>	<i>ni</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>
<i>Aceite Esencial O.V. 75%</i>	10	12.6	1.84
<i>Aceite Esencial O.V. 100%</i>	10	23.0	4.03
<i>Tubo Tratamientol</i>	10	7.0	0.94
<i>Penicilina + Aceite Esencial O.V. 100%</i>	10	21.7	1.42
<i>Penicilina + Aceite Esencial O.V. 75%</i>	10	19.6	1.71

**Gráfico del efecto sinérgico In vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare*, tratamiento control y penicilina con concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*.**





**Tabla N°2:**

**Análisis de varianza para evaluar el efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare*, tratamiento control y penicilina con concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Tratamientos</i>	<i>1839.680</i>	<i>4</i>	<i>459.920</i>	<i>90.417</i>	<i>0.000</i>
<i>Error</i>	<i>228.900</i>	<i>45</i>	<i>5.087</i>		
<i>Total</i>	<i>2068.580</i>	<i>49</i>			

**Tabla N°3:**

**Resumen descriptivo del efecto sinérgico In vitro evaluado en el promedio de halos de unidades formadoras de colonias según grupos de investigación: concentración de aceite esencial de *Origanum vulgare*, tratamiento control y penicilina con concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare***

<i>Grupo de Investigación</i>	<i>ni</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>
<i>Aceite Esencial O.V. 75%</i>	<i>10</i>	<i>0</i>	<i>-</i>
<i>Aceite Esencial O.V. 100%</i>	<i>10</i>	<i>0</i>	<i>-</i>
<i>Tubo Control</i>	<i>10</i>	<i>10x10<sup>8</sup></i>	<i>-</i>
<i>Penicilina + Aceite Esencial O.V. 100%</i>	<i>10</i>	<i>0</i>	<i>-</i>
<i>Penicilina + Aceite Esencial O.V. 75%</i>	<i>10</i>	<i>0</i>	<i>-</i>

**Tabla N°4:****Prueba de Duncan para determinar grupos de investigación estadísticamente significativos.**

<i>Grupo de Investigación</i>	<i>ni</i>	<i>Grupo para alfa = 0.05</i>			
		<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>
<i>Tubo Tratamiento</i>	<i>10</i>	<i>7.0</i>			
<i>Aceite Esencial O.V. 75%</i>	<i>10</i>		<i>12.6</i>		
<i>Penicilina + Aceite Esencial O.V. 75%</i>	<i>10</i>			<i>19.6</i>	
<i>Penicilina + Aceite Esencial O.V. 100%</i>	<i>10</i>				<i>21.7</i>
<i>Aceite Esencial O.V. 100%</i>	<i>10</i>				<i>23.0</i>

## DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto sinérgico in vitro del *Origanum vulgare* con penicilina sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis*.

Luego de realizado el procedimiento los grupos revelaron que el aceite esencial de *Origanum vulgare* y penicilina poseen efecto sinérgico sobre las cepas de *Enterococcus faecalis*<sup>26</sup>. En el mismo estudio se determinó el efecto de la penicilina sola dando un resultado menor que al unirse con el *Origanum vulgare*.

El *Origanum vulgare* tiene efecto bactericida sobre el *Enterococcus faecalis*, comprobado por varios investigadores así como el presente estudio.

El objetivo del presente estudio fue incrementar la susceptibilidad del *Enterococcus* frente a la penicilina utilizando dos concentraciones de 75% y 100%. Ambas concentraciones incrementaron la susceptibilidad del *Enterococcus* hacia la penicilina ; siendo mayor el efecto al 100%. Cuando se utilizó penicilina sola, dio como resultado una sensibilidad baja, la que varió al combinarse con el aceite esencial de *Origanum vulgare* aumentando significativamente la sensibilidad del *Enterococcus*. Por lo tanto se acepta la hipótesis.

Los resultados encontrados son similares a Elaite et al. (2011)<sup>28</sup> donde evaluaron la actividad del aceite esencial de orégano frente a levaduras aisladas, causantes de patologías orales; evidenciando la gran actividad fungicida que presenta el aceite de orégano.

Así mismo el presente estudio concuerda con Albado et al. (2001) donde determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) frente a cepas patógenas referenciales como el *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella cholerae*, *Salmonella tiphymurium* y *Pseudomonas aeruginosa*; concluyendo

que el aceite esencial posee actividad antimicrobiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto frente a la *P. Aeruginosa*.

Por lo tanto, se demuestra el poder antimicrobiano del aceite esencial de orégano. Este efecto se le atribuye a las propiedades medicinales del aceite esencial de *Origanum vulgare* y a las propiedades antimicrobianas de la penicilina. El aceite de orégano y sus principales componentes fenólicos, el Carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil) fenol] y Timol (2-isopropil-5-metilfenol), son conocidos por su amplio espectro de actividad antimicrobiana, varias investigaciones mostraron considerables efectos inhibitorios contra organismos en prueba in vitro. En cuanto a las Penicilinas son empleadas con gran frecuencia por su eficacia terapéutica y escasa toxicidad<sup>26</sup>.

En el área de la odontología los tratamientos con sustancias extraídas de productos herbarios va tomando mas importancia por parte de los investigadores. Es por eso la importancia de determinar el poder antibacterial del aceite esencial de orégano frente al *Enterococcus faecalis* ya que este estudio abre una puerta a futuras investigaciones. Este estudio da pie a la elaboración de nuevos tratamientos como la elaboración de una nueva medicación intraconducto.

## CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Origanum vulgare* y penicilina poseen efecto sinérgico sobre la resistencia del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
2. Se determinó que las concentraciones de 75% y 100% con la penicilina tuvieron efecto antimicrobiano sobre las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC29212.
3. El mayor efecto sinérgico del *Origanum vulgare* y penicilina fue la concentración de 100% frente a las cepas de *Enterococcus faecalis*.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio de aceites esenciales in vitro de *Origanum vulgare* en varias concentraciones con el fin de conseguir efectos antimicrobianos que ayuden en tratamientos terapéuticos.
- Continuar con estudios de sinergismos entre aceite esencial de *Oreganum vulgare* y fármacos.
- Promover tratamientos con productos naturales ya que se ha demostrado los beneficios que poseen.
- Promover la creación de productos a base de aceite esencial de *Origanum vulgare* como una opción para tratamientos endodónticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Byström A, Söngvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontology therapy. *INT ENDOD J*. 1985; 18(1):35-40. En "Efecto inhibitor del aceite esencial de *Mintostachys mollis* en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2 % frente a cepas de *Enterococcus faecalis*". Malpartida Quispe F. *Rev del COP de Región Lima*. Setiembre 2010; 15 (32): 9-12.
2. Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one and two visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: A randomized, clinical trial. *J Endod*. [en línea] 2004; 30 (8): 572-576. [citado 3 de agosto del 2016], Disponible en: [http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(05\)60238-5/fulltext](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(05)60238-5/fulltext)
3. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
4. Peculienė V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26: 593-5.
5. Peculienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34: 429-34.
6. Sundqvist G, Fidgor D, Sjögren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 86-93.
7. Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 100-3.

8. Distel J, Hatton J, Gillespie MJ. Enterococcus faecalis colonization and biofilm formation in medicated root canals. J Endod 2001; 28: 689-93.
9. Murray P, Tenover F, Tenover R. Manual de Microbiología Clínica, 6a ed. Washington, 1995.
10. Lowy F. Infecciones estafilocócicas. En Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J. y Isselbacher K. Harrison Principios de Medicina Interna. 16° Ed. E.E.U.U: Edit Me Graw Hill Interamericana. 2006; pp 911-920.
11. Avila R, Gastelum M, Camacho A, Torres J, Nevárez G. Extracts of Mexican Oregano ( Lippia berlandieri Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. Food Bioprocess Technol. Springer Science. Mexico. 2008. Disponible en: [http://www.springerlink.com/content/w49354j01\\_uwk7407](http://www.springerlink.com/content/w49354j01_uwk7407)
12. Guala M, Elder H, Perez G. y Chiesa A. Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de Schinus molle L. obtenidas por Destilación al Vacío. Información Tecnológica Vol. 2009; 20(2): 8388. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo> [springerlink](http://www.springerlink.com)
13. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S and Chinou B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 4168-4170.
14. Dorman H. and Deans S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl Microbiol. 2000; 88: 308-316.
15. Lambert R, AMIS P, Coote P and Nychas G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of orégano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 2001; 91:453-462.



16. Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lañaras T, Arsenakis M. Antifungal activity of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 1739-1745.
17. Zeytinoglu H, Incesu Z, and Baser K. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human NRAS oncogene. *Phytomedicine.* 2003; 10: 292-299.
18. Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur N, Echard B, Bagchi D, and Preuss G. Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* 2001; 228: 111-117.
19. Celikel N, Kavas G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.* 2008; 26 (3): 174-181
20. Elgayyar M, Draughon F, Golden D, Mount J. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protect.* 2001; 64 (7): 1019-1024.
21. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology.* 2004; 94: 223-253.
22. Trombetta B, Castelli F, Sarpietro M, Venuti V, Cristani M, Daniele C. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2474-2478. Disponible en: <http://aac.asm.org/cgi/reprint/49/6/2474>
23. Soares IL, Goldberg F. *Endodoncia: Técnica y Fundamentos*. Primera edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina 2002.

24. Arias, ME.; Gómez NM, Cudmani M., Vattuone M. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. Life Sciences [revista en línea] 2004 [fecha de acceso 6 de agosto del 2016]; 75, 191-202. URL Disponible en:  
<http://www.aseanbiodiversity.info/abstract/51003253.pdf>
25. Chaves M., Gamboa F., Mora A. Evaluación de dos métodos para la preservación de cepas de *Streptococcus mutans*, centro de investigaciones Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá- Colombia. En “Actividad antimicrobiana sobre organismos cariogénicos”. Aricapa B. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia. Bacteriología, 2009. [fecha de acceso 6 de agosto del 2016]. URL disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf>
26. Lozano L, Larrondo H, Herrera M, y otros. Penicilinas. Acta Médica [Internet]. 1998. [citado 19 de Agosto de 2016]; 8(1): p.33. Disponible en:  
<http://bvs.sld.cu/revista/act/vol8-1-98/act04198pdf>
27. Sangay C, Caderías V. Antibióticos en odontología (primera parte). Kiru. [Internet]. 2005. [citado 22 de Agosto de 2016]; 2(1): p.44. Disponible en:  
[http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2005\\_v2n1/kiru2005v2n1art6pdf](http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2005_v2n1/kiru2005v2n1art6pdf)
28. Elaite, M. Damé, L. Souza, P. Almeida, D. Alves, R. et al. Actividad antibacteriana del aceite de orégano *Origanum vulgare*. ante bacterias aisladas en la leche de bovino. Revista cubana de plantas medicinales. 16(3): 260-266.
29. Palacios E, Mendoza A, Salcedo D. Efecto bactericida in vitro de *Mintostachys mollis* (muña) frente a *Streptococcus* orales. Instituto de Investigación Estomatológica. Lima: UNMSM; 2004.

30. Albado, E.; Saez, G. y Grabiell, S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev. Med. Hered; 2001, 12 (1): 16-19.
31. Thompson W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1ª Edición. Barcelona: Editorial Blume; 1981: 119.
32. Cameroni, G. (2013). Ficha técnica de Orégano “*Oreganum vulgare*”. Revista de alimentos argentinos una elección natural. Marzo, (1-6).
33. Siren EK, Ranta, et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological. Int. Endod. J. 1997; 30: 91-5.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

DETERMINACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO POR KIRBY Y BAUER					
(medida en mm)					
Nº Placa	75%	100%	TC	TT	
				100%	75%
1	15	26	7	21	20
2	12	28	7	21	21
3	14	26	6	23	16
4	16	28	8	21	19
5	13	24	7	22	20
6	11	20	6	24	20
7	11	16	9	21	18
8	11	20	6	22	21
9	11	22	7	19	19
10	12	20	7	23	22

## ANEXO 2

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA							
UFC		75%	75%+P	100%	100%+P	TC Bacteria	TT Penicilina
Nº de Repeticiones	1	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	2	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	3	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	4	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	5	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	6	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	7	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	8	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	9	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0
	10	0	0	0	0	10x10 <sup>8</sup>	0