



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE
ACEITES ESENCIALES DE EUCALIPTO, MENTA,
ORÉGANO Y TOMILLO EN BACTERIAS ASOCIADAS
CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA ZÁRATE CRUZ

TUTOR: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Clave: **IA208220**

INDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Ecología oral.....	8
2.2 Enfermedad periodontal y peri-implantar	10
2.3 Microorganismos asociados con la presencia de enfermedad periodontal y peri-implantar	13
2.3.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	13
2.3.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	14
2.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4 Control mecánico de la biopelícula dental	17
2.5 Control químico de la biopelícula dental	18
2.5.1 <i>Listerine®</i>	19
2.5.2 <i>Clorhexidina</i>	19
2.5.3 <i>Blue®M</i>	21
2.6 Aceites esenciales	22
2.7 Propiedades químicas de los aceites esenciales utilizados en el presente trabajo de investigación.....	26
2.7.1 <i>Aceite esencial de eucalipto</i>	26
2.7.2 <i>Aceite esencial de menta</i>	28
2.7.3 <i>Aceite esencial de orégano</i>	30
2.7.4 <i>Aceite esencial de tomillo</i>	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
4. JUSTIFICACIÓN.....	38
5. HIPÓTESIS.....	39
6. OBJETIVOS	39
6.1 Objetivo general.....	39
6.2 Objetivos específicos.....	39
7. MATERIALES	39
7.1 Recursos humanos.....	39
7.2 Recursos materiales para el cultivo de microorganismos	40
7.3 Recursos para las pruebas de inhibición bacteriana	40

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL	41
8.1 Cultivo de microorganismos	42
8.2 Pruebas de antibiogramas.....	42
8.3 Análisis estadístico	44
9. RESULTADOS	44
9.1 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	44
9.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana <i>Porphyromonas gingivalis</i>	46
9.3 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
9.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana <i>Staphylococcus aureus</i>	50
10. DISCUSIÓN	53
11. CONCLUSIONES	59
12. PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

En la presente investigación se demostró el efecto antibacteriano *in vitro* de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus radiata*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) en las cepas bacterianas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

El experimento se llevó a cabo mediante pruebas de sensibilidad bacteriana (antibiogramas). Se realizó la siembra de las cuatro cepas en diferentes cajas de Petri, donde se colocaron discos de papel Whatman, cada disco fue embebido individualmente en los diferentes aceites esenciales; CHX (0.12%), Listerine®, y Enjuague Blue®M fueron utilizados como controles positivos, mientras que, como control negativo se utilizó medio de cultivo líquido. Cada una de las cepas fue incubada durante 2 y 7 días, para las bacterias aerobias y anaerobias, respectivamente. La determinación del grado de sensibilidad fue evaluada en función del tamaño de los halos de inhibición que se observaron alrededor de cada disco.

Se encontró que el aceite esencial de orégano mostró el mayor efecto antimicrobiano contra las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, mientras que las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* mostraron mayor sensibilidad al aceite esencial de tomillo. Los aceites esenciales de menta y eucalipto mostraron el menor efecto antibacteriano contra las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. aureus*, mientras que no mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que el uso de aceites esenciales representa una alternativa prometedora para el control de infecciones periodontales.

Palabras clave: aceites esenciales, menta, eucalipto, orégano, tomillo, enfermedad periodontal, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

In the present study, the *in vitro* antibacterial effect of the eucalyptus (*Eucalyptus radiata*), peppermint (*Mentha piperita*), oregano (*Origanum vulgare*), and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oils against the bacterial strains *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was evaluated.

The experiment was carried out through bacterial susceptibility tests (antibiograms). The four bacterial strains were placed in Petri dish, Whatman paper discs were placed in each plate, individually each disc where embedded in the different essential oils; CHX (0.12%), Listerine®, and Blue®M Rinses were used as positive controls, while broth culture medium was used as a negative control. Each Petri dish was incubated for 2 and 7 days, for aerobic and anaerobic bacteria, respectively. The degree of sensitivity was evaluated according to the size of the inhibition zones measured around each disc.

It was found that the oregano essential oil showed the greatest antimicrobial effect against the bacterial strains *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, while the bacteria *P. aeruginosa* and *S. aureus* showed greater sensitivity to the thyme essential oil. The mint and eucalyptus essential oils showed the least antibacterial effect against the bacterial strains *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *S. aureus*, while they did not show an inhibitory effect on the growth of *P. aeruginosa*.

Based on the results obtained in the present work, we can conclude that the use of essential oils represents a promising alternative for the chemical control of periodontal infections.

Keywords: essential oils, peppermint, eucalyptus, oregano, thyme, periodontal disease, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUCCIÓN

En la cavidad oral coexisten alrededor de 700 especies bacterianas, las cuales interactúan entre ellas y el hospedero ¹. Esto representa un ecosistema complejo debido a que existe una gran diversidad de microorganismos capaces de colonizar la cavidad oral. En condiciones compatibles con salud, las especies microbianas se encuentran en relación simbiótica con el hospedero, sin embargo, si existe una pérdida del balance, se produce una disbiosis en la microbiota que coloniza la cavidad oral, lo que puede generar la aparición de diversas patologías bucales ². Un ejemplo de este desequilibrio lo representa la enfermedad periodontal, una patología que es causada por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de la biopelícula dental ³, la periodontitis representa un estado patológico causado por una inflamación crónica persistente de los tejidos de soporte periodontales, lo que lleva a la destrucción del hueso alveolar y la eventual pérdida de dientes ⁴, por lo que ha sido de gran relevancia en el ámbito odontológico ya que es una de las infecciones bacterianas más prevalentes en la cavidad oral de los seres humanos ⁵.

La prevención de enfermedades periodontales se basa esencialmente en el control de la biopelícula supragingival, inicialmente con un control físico por medio de métodos mecánicos (cepillado dental, pulido dental, uso de hilo dental, raspado y alisado radicular o cirugía periodontal) de forma adecuada y regular, lo que puede ayudar a lograr la salud oral y periodontal del paciente ⁶. Sin embargo, hay diferentes situaciones en las que este control mecánico no es suficiente, por lo que el uso complementario de métodos químicos (sustancias antisépticas y/o antibióticas) puede ayudar a controlar el desarrollo de la biopelícula dental, así como interferir en la adherencia de las bacterias a la superficie dental. Este control está dado por diversos químicos que son utilizados como enjuagues orales, el más utilizado hasta el momento es la clorhexidina (CHX), considerado el “estándar de oro” de los antisépticos orales por sus propiedades antimicrobianas y antisépticas ^{7,8}, sin embargo, su uso prolongado produce efectos adversos como manchas en los dientes y lengua, además de alteraciones en la percepción del gusto, entre otras ⁹, por lo que se ha considerado el uso de alternativas más naturales para el control de la biopelícula dental, a través de la extracción de compuestos obtenidos de plantas, como los aceites esenciales, que se han reportado con un efecto antimicrobiano relevante. Un producto característico de este grupo es el enjuague Listerine[®], compuesto por aceites esenciales como mentol (menta) 0.042%, timol (tomillo) 0.064%, salicilato de metilo (gaulteria) 0.06% y eucaliptol

(eucalipto) 0.092% ¹⁰. Clínicamente, se ha demostrado que este antiséptico oral reduce significativamente la biopelícula dental preformada y reduce la presencia de gingivitis ¹¹. Pero uno de sus principales efectos adversos es la sensación de quemadura y gusto amargo ¹².

Por lo anterior, se considera importante investigar diferentes alternativas para el control químico de la biopelícula dental que sean más naturales, de fácil implementación y acceso, y que se reporten con menos efectos adversos. El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre cuatro especies bacterianas asociadas con la enfermedad periodontal. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* asociadas con el desarrollo de la enfermedad periodontal, mientras *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* han sido asociadas con el desarrollo de peri-implantitis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ecología oral.

La cavidad oral representa un ecosistema complejo, cuyas condiciones ambientales permiten la colonización microbiana. Se ha identificado que en la cavidad oral coexisten más de 700 especies bacterianas que interactúan entre ellas y el hospedero ¹.

En la naturaleza, las bacterias existen bajo dos estados: bacterias planctónicas (1%), es decir, viven como microorganismos libres flotando en el medio líquido y bacterias sésiles (99%) que son las que se adhieren a una superficie y por lo tanto son integrantes de colonias de microorganismos en las biopelículas ¹³. Las biopelículas se forman cuando las bacterias planctónicas encuentran una superficie acondicionada, se adhieren a ella y, a continuación, elaboran señales químicas para coordinar la organización y desarrollo de microcolonias de bacterias encapsuladas en una matriz de sustancia polimérica extracelular ¹³. La matriz polimérica extracelular que rodea a las biopelículas está muy hidratada ya que incorpora hasta el 97 % de agua dentro de su estructura ¹³.

Las microcolonias bacterianas que forman parte de las biopelículas se encuentran separadas unas de otras por canales de agua (espacios intersticiales) que pueden transportar nutrientes y liberar desechos de los microorganismos que habitan en dichas microcolonias ¹⁴.

Se reconoce que las biopelículas constituyen la forma de crecimiento predominante de muchas especies bacterianas ¹⁵, aproximadamente el 95% de las bacterias que hay en la naturaleza se encuentran en las biopelículas ¹⁶, y pueden estar en cualquier ambiente líquido, es decir, una interfase sólido-líquida entre una superficie y un medio acuoso (por ejemplo, el agua o la sangre) que proporciona un entorno ideal para la fijación y crecimiento de microorganismos ¹⁷.

Las células que se encuentran en las biopelículas se vuelven altamente resistentes a los antibióticos y a los mecanismos de defensa del huésped, ya que los microorganismos dentro de una biopelícula están protegidos dentro de una matriz de exopolisacáridos, causando que los anticuerpos, las células del sistema inmune y los antimicrobianos, no tengan acceso a ella ¹⁸. Es por esto último que las biopelículas tienen una gran relevancia en el área médica y odontológica, ya que favorecen el desarrollo de infecciones crónicas como otitis, osteomielitis, infecciones de heridas y periodontitis ^{4,19}, entre otras. Además de estar relacionadas con el desarrollo de infecciones asociadas con el uso de dispositivos médicos, entre ellos catéteres intravasculares, prótesis articulares, catéteres urinarios y peri-implantitis ^{19,20}.

Se sabe que una de las biopelículas más importantes y complejas presentes en la cavidad oral es la biopelícula dental, cuya formación y desarrollo depende de la adhesión de las bacterias orales a las superficies dentales ¹⁶. Las superficies dentales, tejidos blandos, superficies de biomateriales o dispositivos utilizados para la rehabilitación en la cavidad oral proveen un sustrato adecuado para la colonización bacteriana en la cavidad oral y para la formación de biopelículas ¹⁴.

Las bacterias en la biopelícula dental no se encuentran dispuestas de manera aleatoria ²¹. En la cavidad oral se reconocen distintos hábitats de colonización microbiana que constituyen un sistema ecológico muy heterogéneo, estos hábitats: dientes, surco gingival, encía, lengua, mejilla, labios y paladar, favorecen el crecimiento de comunidades microbianas diferentes ²².

En la superficie del diente, podemos encontrar una biopelícula clasificada en relación con el margen gingival. La biopelícula más inicial es supragingival y más tarde se extiende al área subgingival ²³. Ambas biopelículas están delimitadas por la superficie del diente y clínicamente se diferencian de acuerdo con su posición en el margen gingival, esto hace que ciertos microorganismos aparezcan en ambas ²⁴. La biopelícula supragingival está

expuesta a la saliva, mientras que la biopelícula subgingival está delimitada por el epitelio del surco gingival y se encuentra más expuesta al fluido crevicular ¹.

La complejidad de la composición y formación de biopelícula en la cavidad oral es debido, en parte a la gran diversidad de microorganismos capaces de colonizarla, las bacterias de la biopelícula dental viven en equilibrio mientras las condiciones externas se mantengan constantes, sin embargo, si existe la pérdida del balance o de la adaptación microbiana, se produce una disbiosis, la cual permitirá la aparición de múltiples patologías orales que pueden llegar a repercutir en la salud general ².

Dos de las infecciones bacterianas más prevalentes en la cavidad oral de los seres humanos causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas dentales son la caries y la enfermedad periodontal ^{3,5}. Según datos de la OMS, las enfermedades orales afectan a casi 3 500 millones de personas en todo el mundo, siendo la caries dental en dientes permanentes la más prevalente con 2 300 millones de personas afectadas ²⁵. En cuanto a la enfermedad periodontal, se estima que las formas graves afectan a casi el 10% de la población mundial y sus principales causas son la mala higiene dental y el consumo de tabaco ²⁵.

2.2. Enfermedad periodontal y peri-implantar.

La enfermedad periodontal es referida como una enfermedad inflamatoria polimicrobiana compleja, asociada con la disbiosis de la biopelícula dental que induce una inflamación crónica persistente de los tejidos de soporte periodontales, lo que lleva a la destrucción del hueso alveolar y la eventual pérdida dental ⁴. La gingivitis es la primera manifestación patológica de la respuesta inmune-inflamatoria del individuo a la acumulación de una biopelícula disbiótica, esta enfermedad se caracteriza por la presencia de inflamación gingival en ausencia de pérdida de inserción clínica, destrucción del ligamento periodontal o pérdida ósea, es reversible si se procede a la reducción de los niveles de la biopelícula dental acumulada ²⁶. Los microorganismos identificados en sitios con gingivitis son principalmente Gram negativos, anaerobios como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium* sp., *Actinomyces viscosus*, y *Veillonella parvula*, siendo especies de *Actinomyces* y *Streptococcus* las más predominantes ²⁷.

Si la eliminación mecánica de la biopelícula dental no es llevada a cabo de forma adecuada y periódicamente, esta fase de inflamación gingival puede progresar a periodontitis ²⁸, la cual se caracteriza por la presencia de inflamación gingival en sitios

donde se ha producido la migración apical del epitelio de unión, acompañado de una destrucción de los tejidos de inserción del diente provocando pérdida de dientes parcial o total, esto último asociado a dificultades funcionales y estéticas ^{28,29}. En los últimos años la enfermedad periodontal también se ha asociado con problemas de salud sistémico ^{28,30,31}.

De acuerdo con Haffajee y Socransky ³², las bacterias más frecuentemente aisladas de sitios con periodontitis son: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y varias especies de espiroquetas como *Treponema denticola*, además de otros microorganismos asociados con menor frecuencia, los cuales también aparecen en las diversas formas de enfermedad periodontal ³³.

Las biopelículas no solo se forman sobre los dientes, como se mencionó anteriormente, hay diferentes zonas en la cavidad oral que son susceptibles a una colonización bacteriana, también se pueden formar sobre superficies artificiales expuestas al medio ambiente bucal, como en biomateriales y otros dispositivos empleados para la rehabilitación y restauración de alguna estructura pérdida en la cavidad oral, como los implantes dentales ¹⁴.

La peri-implantitis es definida como una entidad patológica asociada a una biopelícula disbiótica acumulada en los tejidos que rodean a implantes dentales osteointegrados. Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación de la mucosa peri-implantaria con la subsecuente pérdida progresiva del tejido óseo que rodea a los implantes osteointegrados ³⁴. Evidencia indica que un control deficiente de la biopelícula, antecedentes de enfermedad periodontal previa y el tabaquismo, son identificados como indicadores de riesgo asociados al desarrollo de peri-implantitis ^{34,35}.

Al respecto, los pacientes con antecedentes de enfermedad periodontal previa pueden tener un mayor riesgo de desarrollar peri-implantitis, esto debido a la proximidad de los implantes con los dientes que podría condicionar la presencia de microorganismos patógenos periodontales en los surcos peri-implantares ³⁶. El componente microbiano podría representar una explicación plausible para la relación establecida entre las enfermedades periodontales y peri-implantares ³⁷. De hecho, clínicamente, microambientes similares, incluyendo surco y bolsa periodontal, se presentan alrededor de implantes dentales y dientes, lo que podría favorecer la colonización de bacterias similares ³⁸. Sin embargo, las infecciones alrededor de los implantes pueden además estar relacionadas

con microorganismos que normalmente no se encuentran en lesiones crónicas de periodontitis, estudios previos han identificado que algunas bacterias como *Staphylococcus aureus*^{39,40} y *Pseudomonas aeruginosa*^{41,42} tienen un papel asociado al desarrollo de la peri-implantitis debido, entre otras cosas, a su alta afinidad por el titanio⁴³.

La microflora asociada con sitios peri-implantares sanos está relacionada con la presencia de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, observándose un incremento en el recuento de bacilos anaerobios Gram negativos y una disminución de la proporción de cocos Gram positivos en sitios pre-implantares con mucositis⁴⁴. Conforme el daño pre-implantar progresa, la microflora continúa cambiando, detectándose incrementos en las proporciones de *Porphyromonas gingivalis*, y en algunos casos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *P. gingivalis* es una bacteria encontrada frecuentemente en bolsas profundas, y su predominio en localizaciones peri-implantarias profundas pueden acelerar la pérdida del tejido peri-implantar⁴⁴.

En un análisis comparativo de 166 individuos con peri-implantitis y 47 individuos con tejidos peri-implantares sanos, se encontró que tanto *P. aeruginosa* como *S. aureus* estaban presentes con mayor frecuencia en muestras de peri-implantitis, junto con periodontopatógenos clásicos como *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*³⁵.

Albertini *et al.*, realizaron un estudio donde se evaluó la presencia de microorganismos periodontales y oportunistas en pacientes con peri-implantitis, ellos encontraron que en conjunto *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans* colonizaron las superficies de los implantes colocados en el 15% de los pacientes, mientras que *P. aeruginosa* se encontró en cuatro pacientes (12%), siendo *P. aeruginosa* el patógeno oportunista más prevalente encontrado en dicho estudio³⁵.

Aunque *S. aureus*, *Enterobacteriaceae* sp., *Candida albicans*, *P. aeruginosa* son bacterias que no están típicamente asociadas con la flora bacteriana oral, y muy raramente asociadas con el desarrollo de la enfermedad periodontal, son bacterias capaces de adherirse con éxito a las superficies de titanio de los implantes dentales³⁵, no obstante, se necesitan más estudios clínicos para evaluar el papel de los patógenos oportunistas: *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* en el desarrollo de la peri-implantitis.

2.3. Microorganismos asociados con la presencia de enfermedad periodontal y peri-implantar.

2.3.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Es un cocobacilo corto, se puede presentar en forma aislada, en pares o en pequeños racimos ⁴⁵. Gram negativo, anaerobio facultativo, no móvil (carece de flagelos), sacarolítico (fermenta carbohidratos), capnófilo (requiere CO₂ para su desarrollo), crece bien en atmósfera con CO₂ de 5% o en condiciones de anaerobiosis ⁴⁵.

Los factores de virulencia determinan la capacidad del microorganismo para desarrollar una patología, en el caso de *A. actinomycetemcomitans* presenta en su estructura fimbrias, vesículas y produce un material amorfo extracelular proteico, que le permite adherirse a las células huésped y contribuyen a su virulencia, siendo esta adherencia el primer paso de todo proceso infeccioso ⁴⁶.

Se han descrito 5 serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (a-e), con más de un serotipo encontrado en la boca de un individuo. El serotipo b de esta bacteria es comúnmente encontrado en la periodontitis agresiva ⁴⁷ y los serotipos d, e y f se han detectado rara vez en las poblaciones ⁴⁸.

Como patógeno oportunista se puede encontrar en una variedad de infecciones como bacteremia, septicemia, endocarditis infecciosa, aterosclerosis, neumonía, infecciones de la piel, osteomielitis, infecciones del tracto urinario, en diferentes tipos de abscesos, glomerulonefritis y endoftalmitis ^{45,49}. Es susceptible a cefalosporinas, tetraciclinas y fluoroquinolonas, describiéndose resistencias a penicilina, ampicilina, amikacina y macrólidos ⁴⁵.

A. actinomycetemcomitans es uno de los primeros colonizadores de la biopelícula de las superficies dentales, lo que sugiere que puede colonizar superficies limpias y sanas ⁴⁵. Cuando *A. actinomycetemcomitans* está presente en un paciente no tratado periodontalmente, puede persistir durante mucho tiempo, lo que indica que es capaz de evadir los mecanismos de defensa del huésped ⁴⁹. La literatura indica que el tratamiento de raspado y alisado radicular es insuficiente para erradicar este organismo, ya que este microorganismo tiene la capacidad de invadir los tejidos gingivales ⁴⁹.

2.3.2. *Porphyromonas gingivalis*.

Es un cocobacilo capsulado, Gram negativo, anaerobio estricto, no móvil, fimbriado, asacarolítico (no fermentan carbohidratos), que produce colonias con pigmentaciones marrones en medio de cultivo agar-sangre ⁵⁰.

Esta bacteria puede ser aislada de la saliva, lengua, amígdalas, biopelícula dental y otros sitios de la boca, y se presenta en altas proporciones y frecuencia en pacientes con bolsas periodontales ⁵⁰. Coloniza en forma tardía o secundaria la cavidad oral, proceso que es facilitado por la presencia de otras especies bacterianas, los colonizadores primarios, que proporcionan sitios de unión y nutrientes, y que contribuyen a reducir la tensión de oxígeno a niveles óptimos para su crecimiento ⁵¹.

Mientras que esta bacteria no se asocia típicamente con infecciones extraorales ⁵⁰, Río M. ha sugerido que se puede encontrar en severas infecciones mediastinales de planos faciales, cerebro y abscesos pulmonares, enfermedades cardíacas, en neonatos nacidos de partos prematuros y con bajo peso al nacer ⁵².

De acuerdo con los postulados adaptados de Haffajee y Socransky, *P. gingivalis* tiene las condiciones necesarias para ser considerada un microorganismo patógeno periodontal ^{27,53}. Por lo tanto, tiene una elevada correlación con la progresión y severidad de la enfermedad periodontal ⁵⁰, además consigue originar daño inmediato a las estructuras periodontales por medio de los variados factores de virulencia que posee, como lo son las fimbrias, estas se comportan como adhesinas y posibilitan la adherencia a diversos tejidos y células, además de favorecer la coagregación entre *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* ⁵⁰.

P. gingivalis suele encontrarse en zonas con inflamación periodontal, aumento de la profundidad de sondaje, pobre higiene oral y pérdida de inserción ⁵⁰. Realizar raspados y alisados radiculares en sitios con bolsas periodontales puede ayudar a disminuir temporalmente los niveles de *P. gingivalis*, sin embargo, no se logra una erradicación definitiva, ya que muchas veces esta bacteria suele localizarse en zonas de difícil acceso como las furcas ⁵⁰.

2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*.

Es un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvado, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, es aerobio facultativo (puede desarrollarse en condiciones

anaerobias utilizando nitrato)⁵⁴, es catalasa positivo y oxidasa positivo, produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa y lactosa o sacarosa, sin embargo, no fermenta hidratos de carbono⁵⁵. Esta bacteria presenta muchas propiedades de virulencia como flagelo, fimbrias (pili), producción de matriz exopolisacárida, que incluyen la capacidad de sintetizar y secretar enzimas extracelulares y toxinas para adherirse y formar biopelículas en los tejidos y superficies abióticas, lo cual ha dificultado el tratamiento terapéutico dirigido a éste patógeno, así como a presentar resistencia a muchos antibióticos⁵⁵.

Una vez establecido en el paciente, *P. aeruginosa* exhibe muchos mecanismos de resistencia, incluyendo enzimas que modifican a los antimicrobianos como β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, la adquisición plásmidos que codifican para genes de resistencia, permeabilidad limitada para los antimicrobianos y la posibilidad de generar una bomba dependiente de energía que expulsa al antimicrobiano fuera de la bacteria, lo que hace que la terapia contra este patógeno Gram negativo sea desafiante debido a la falta de nuevas terapias antimicrobiana⁵⁶.

Esta bacteria tiene la capacidad de crecer en biopelícula, lo que puede aumentar su capacidad de causar infecciones al proteger a las bacterias frente a las defensas del huésped⁵⁷.

P. aeruginosa se considera un patógeno oportunista que se establece sobre el huésped humano, su letalidad es más evidente en los pacientes inmunocomprometidos como en el caso de pacientes quemados o que tienen fibrosis quística⁵⁶, pero también es un problema importante en heridas crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y crecimiento superficial en biomateriales implantados^{58,59}. Es el principal microorganismo relacionado con las infecciones nosocomiales, responsable aproximadamente de 10 a 15% de las infecciones nosocomiales mundiales⁵⁶. Además de ser responsable de varias enfermedades infecciosas pulmonares, cutáneas, otitis, además de úlceras corneales, endocarditis, etc.

P. aeruginosa suele estar presente en superficies húmedas, en respiradores, humidificadores, además, también puede formar parte de la microbiota de las zonas húmedas de la piel como axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas; ocasionalmente puede colonizar las superficies de manos de trabajadores de la salud⁶⁰.

Se han encontrado asociaciones entre la colonización de la cavidad oral por *P. aeruginosa* y las infecciones respiratorias, sugiriéndose que una mala higiene oral y la

presencia de enfermedad periodontal puede contribuir a esta condición, especialmente en pacientes hospitalizados e inmunodeprimidos ⁶¹. Además, se ha sugerido que las interacciones entre los patógenos periodontales y *P. aeruginosa* podrían contribuir a la capacidad de esta bacteria para invadir células epiteliales y difundirse sistémicamente ⁶¹.

Albertini *et al.*, realizaron un estudio donde se evaluó la presencia de microorganismos periodontales y oportunistas en pacientes con presencia de peri-implantitis, y se encontró a *P. aeruginosa* fue el patógeno oportunista más prevalente. La presencia de esta bacteria fue más prevalente en fumadores (20%) que en no fumadores (9%) ³⁵.

Por otro lado, estudios *in vitro* identificaron una alta afinidad de *P. aeruginosa* y *S. aureus* por las superficies de titanio ³⁵. También se demostró que todos los aislados de *P. aeruginosa* fueron sensibles a la ciprofloxacina, ceftazidima y aminoglucósidos, sin embargo, la clorhexidina, que puede tener uso generalizado en el tratamiento de la peri-implantitis, ha presentado algunos inconvenientes, ya que se reporta que puede potenciar el crecimiento de *P. aeruginosa* en algunas concentraciones bajas ³⁵.

A pesar de que la mayoría de los estudios han recuperado microbiota periodontal anaeróbica alrededor de implantes y dientes, se requieren más estudios para establecer una relación directa entre la prevalencia de especies como *P. aeruginosa* y *S. aureus* en superficies de implantes dentales de titanio en el desarrollo de peri-implantitis ³⁵.

2.3.4. *Staphylococcus aureus*.

El género *Staphylococcus* está integrado por 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas especies forman parte de la microbiota de piel y mucosas y otras se encuentran sólo en la flora microbiana de otros mamíferos y aves. El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula ⁶².

S. aureus es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo ⁶², crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro corazón infusión agar, sus colonias se observan lisas, elevadas, brillantes, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va de amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre ⁶³.

De forma general, *S. aureus* se considera una bacteria oportunista que forma parte de la microflora humana, puede convivir con el huésped humano sin causar ningún daño. La colonización más frecuente por *S. aureus* es la mucosa nasal, el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o el portador⁶², también se ha aislado de nasofaringe, la lengua, la saliva, superficies mucosas, superficies dentales supragingivales y de la bolsa periodontal⁶⁴.

Sin embargo, bajo algunas condiciones *S. aureus* puede estar asociada con infecciones de la cavidad oral y lesiones de la mucosa oral⁶⁴, además de infecciones de piel y partes blandas, puede producir infecciones invasivas como neumonía, osteomielitis, bursitis, artritis, y es una de las principales bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos⁶⁵.

Se ha sugerido que, debido a su alta afinidad por el titanio, es una bacteria de colonización temprana en superficies de implantes dentales y un patógeno asociado con el desarrollo de peri-implantitis⁶⁶⁻⁶⁸.

2.4. Control mecánico de la biopelícula dental.

La remoción mecánica de la biopelícula dental por métodos físicos es considerada la piedra angular para el mantenimiento de la salud oral⁶. El cepillado dental tiene el potencial de eliminar mecánicamente la biopelícula supragingival, manteniendo una estabilidad de los tejidos periodontales y peri-implantarios, previniendo también el desarrollo de la caries⁶⁹. Sin embargo, a pesar de ser una estrategia muy difundida y de eficacia probada, puede verse limitada por algunos factores como: el desconocimiento de la técnica correcta de cepillado por parte del paciente, la presencia de factores iatrogénicos en cavidad oral como obturaciones desbordantes o prótesis mal ajustadas, además de no ser utilizada de forma regular por muchos pacientes (pacientes poco cooperadores)¹⁴. La recomendación por los profesionales dentales sobre la frecuencia del cepillado dental es de 2 a 3 veces al día, aunque existen estudios que demuestran que la eliminación de la biopelícula dental cada 48 horas es suficiente para prevenir el desarrollo de caries y gingivitis¹⁴. Se considera que, si se utiliza únicamente el cepillo de dientes, este es capaz de eliminar hasta 1mm de biopelícula subgingival, sin embargo, es ineficaz en el área interproximal⁶⁹, ya que es una zona de difícil acceso con un cepillo. Debido a esto, también se requieren durante la higiene oral el uso de dispositivos como el hilo dental y los cepillos interdentales que ayuden al paciente a remover la biopelícula dental de estas zonas.

Diferentes estudios han demostrado que el control mecánico por sí solo puede no ser suficiente para prevenir la aparición o recurrencia de enfermedades periodontales ⁷⁰, por lo que el uso complementario de métodos químicos puede reforzar el control del desarrollo de las biopelículas dental.

2.5. Control químico de la biopelícula dental.

A pesar de los buenos resultados que pueden ser logrados con el uso de métodos mecánicos para el control del desarrollo la biopelícula dental, uno de los mayores inconvenientes es que muchos de los pacientes no pueden, no quieren o no están capacitados para practicar eficazmente estos métodos ⁹. Por otro lado, hay pacientes que requieren ayuda adicional más allá de los métodos físicos para el control de la biopelícula dental, debido a esto, se han desarrollado agentes quimioterápicos utilizados como coadyuvantes en la terapia para el control de la biopelícula dental⁶.

Se han propuesto diferentes características ideales para un agente químico: ^{9,71}

- Especificidad: Los agentes y las formulaciones para el control químico deben demostrar un amplio espectro de acción, contra bacterias, virus y hongos.
- Eficacia: La capacidad antimicrobiana debe ser demostrada contra microorganismos implicados en la gingivitis y periodontitis, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.
- Sustantividad: Duración de la acción antimicrobiana *in vivo*. Es una medida del tiempo de contacto entre el agente y el sustrato en un medio definido. El agente necesita cierto tiempo de contacto con el microorganismo para inhibirlo o eliminarlo.
- Seguridad: Debido a la cronicidad de las condiciones que deben prevenirse y al uso esperado a largo plazo, los efectos secundarios deben ser mínimos.
- Estabilidad: Deben ser estables a temperatura ambiente durante un período prolongado de tiempo.
- Facilidad de uso.

Desafortunadamente, actualmente, no hay algún agente químico que cumpla con todas las características antes mencionadas ⁶.

Los agentes químicos pueden influir cualitativamente (alterando la vitalidad de la biopelícula) y cuantitativamente (reducción de microorganismos) en la biopelícula mediante diferentes mecanismos de acción: ⁷²

- Anti-adhesión: Impiden la fijación inicial de las bacterias formadoras de la biopelícula primaria.
- Antimicrobianos: Evitan el crecimiento bacteriano y/o la coagregación. Por medio de la inhibición de la proliferación bacteriana (efecto bacteriostático) y/o por la lisis de los microorganismo que se están adhiriendo o que ya están adheridos a la superficie dental (efecto bactericida).

Los enjuagues orales se han utilizado desde hace más de 4000 años ¹⁴ debido a sus propiedades anti-biopelícula y anti-gingivitis que pueden coadyuvar a los efectos que brinda el control mecánico de la biopelícula dental ⁷, la eficacia de estos enjuagues se atribuye a los agentes químicos que poseen. La clorhexidina (CHX), el triclosán, el fluoruro de estaño y los aceites esenciales (AEs) han mostrado ser inhibidores de la biopelícula dental, ya sean en su presentación como dentífrico o colutorio ²¹. Por lo tanto, es importante comentar las características de los agentes utilizados en la presente investigación.

2.5.1. Listerine®.

Este producto fue creado en 1879 por el Dr. Joseph Lawrence, con el fin de tener un antiséptico único para el uso en cirugías y para limpiar heridas. En 1881 Lambert Pharmaceutical Co. compra los derechos de la fórmula Listerine® y comienza a producirlo y comercializarlo. Este enjuague bucal contiene en su fórmula original, a base de alcohol, como ingredientes activos a los AE de mentol (menta) 0.042%, timol (tomillo) 0.064%, salicilato de metilo (gaulteria) 0.06% y eucaliptol (eucalipto) 0.092%. En combinación, estos EA tienen un efecto antiséptico y se cree que el salicilato de metilo puede tener además un efecto antiinflamatorio ⁷³. El etanol es tóxico a las bacterias en concentraciones del 40%, y está presente en el producto comercial Listerine®, en concentraciones de 26%, para disolver los ingredientes activos presentes en la formulación ^{14,76}. El alcohol en los colutorios se utiliza como vehículo disolvente de los principios activos de los enjuagues, sin embargo, se han reportado efectos adversos asociadas con la presencia de alcohol en estos enjuagues. El alcohol a elevadas concentraciones puede tener efectos lesivos en la mucosa, por lo que no se recomienda su utilización en pacientes que por diversas causas la mucosa oral se encuentra alterada, por ejemplo, pacientes con mucositis, inmunodeprimidos, irradiados de cabeza y cuello, etc. Además, está contraindicado en embarazadas, niños (debido al riesgo de intoxicación), alcohólicos (se puede injerir como sustituto de una bebida alcohólica) ⁷⁴.

Debido a esto, la mayoría de los enjuagues orales, incluyendo Listerine®, ofrecen como alternativa una gama de productos formulados sin alcohol ⁷⁵. Clínicamente, se ha demostrado que este antiséptico oral reduce significativamente la biopelícula dental preformada y reduce significativamente la presencia de gingivitis ⁷⁶.

2.5.2. Clorhexidina.

Hoy en día, la clorhexidina (CHX) sigue siendo considerada como el estándar de oro dentro de los antisépticos para el control de la biopelícula dental por su efecto anti-biopelícula y anti-gingivitis ^{7,8}.

La CHX fue desarrollada en la década de 1940 por Imperial Chemical Industries de Inglaterra, los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibiguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel. Posteriormente comenzó a usarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano. En el campo de odontología se usó inicialmente para la desinfección prequirúrgica de la boca y en endodoncia ⁷⁷.

Es un compuesto químico que presentan un amplio espectro de acción, siendo activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y virus, incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de hepatitis B ⁷⁷. Posee una base fuerte dicatiónica, a pH superior a 3,5 con dos cargas positivas en cada extremo de un puente de hexametileno. Debido a su naturaleza dicatiónica es extremadamente interactiva con los aniones, lo que es importante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales. Es incolora, inodora y de sabor amargo, estable a temperatura ambiente, sus distintas sales, diacetato, diclorhidrato, digluconato, son más solubles en alcohol que en agua. Aunque el digluconato es la sal más soluble en agua, en presencia de materia orgánica, se inactiva fácilmente ⁷⁷. Es bacteriostática a bajas concentraciones contra una variedad de bacterias orales, además tiene un efecto de sustantividad, es decir, que al adherirse a la superficie de los dientes dura más tiempo en ellos, favoreciendo su efecto anti-biopelícula ⁷⁸, sin embargo, es debido a esta propiedad que la CHX posee efectos adversos, principalmente la pigmentación de los dientes y la reducción de la percepción de sabores si es usada por largos periodos ⁷⁹.

Su efecto antimicrobiano depende de la concentración, la CHX se une con fuerza a la membrana plasmática y en bajas concentraciones, incrementa la permeabilidad de la

membrana con pérdida de componentes intracelulares (efecto bacteriostático). A altas concentraciones, induce la precipitación de las proteínas citoplasmáticas y la muerte celular (efecto bactericida)⁷⁸.

En la boca se adsorbe con rapidez a las superficies como los dientes recubiertos por una película salival acondicionante, una vez adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa, después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo⁷¹.

No existen informes sobre su toxicidad sistémica al aplicarla por vía tópica o por ingesta, ni evidencias de teratogenicidad en modelos animales. Tampoco existe evidencia sobre resistencia bacteriana por uso bucal durante periodos prolongados. Sin embargo, la CHX no está exenta de eventos adversos como:⁹

- Coloración parda de los dientes, mucosa, algunos materiales de restauración y del dorso de la lengua. Siendo los dientes y la lengua los sitios más afectados. Los antisépticos o iones metálicos unidos localmente a la mucosa o a los dientes pueden reaccionar con polifenoles en productos como como el café, té, vino y tabaco para producir las pigmentaciones.
- Alteración del gusto. Siendo el sabor amargo y salado los comúnmente afectados. Esta alteración es reversible.
- Erosión de la mucosa bucal. Reacción dependiente de la concentración.
- Tumefacción unilateral o bilateral de la parótida.
- Reacción de hipersensibilidad.
- Aumento de la formación de cálculo supragingival debido a la precipitación de proteínas de la saliva sobre la superficie dental, lo que incrementa la precipitación de sales inorgánicas o el espesor de la película salival adquirida.

2.5.3. Blue®M.

Actualmente, se encuentra en el mercado odontológico una marca de productos para la higiene oral basados en oxígeno activo, desarrollados por un equipo dirigido por el Dr. Peter Blijdorp⁸⁰.

Los principales productos de la marca son: gel oral, pasta de dientes y enjuague oral. Estos productos se pueden utilizar después de cirugías orales como coadyuvante al cepillado de dientes, para tratar la inflamación gingival, peri-implantitis, entre otros⁸¹.

El enjuague Blue[®]M contiene cantidades de oxígeno activo, además de ser libre de alcohol y flúor, ya que evitan que el alcohol deshidrate las membranas mucosas y el flúor que dañe los implantes causando corrosión en la capa superior de titanio⁸². La marca promete que este producto ayuda a mantener los dientes y encías saludables, además de reducir la posibilidad de inflamación de las encías, ayuda en el tratamiento de úlceras, peri-implantitis y periodontitis⁸⁰. Sin embargo, no existen suficientes estudios *in vivo* e *in vitro* que respalden que estos productos tienen una buena efectividad para el tratamiento de enfermedades orales como la peri-implantitis.

2.6. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AEs) son conocidos desde épocas antiguas debido a sus propiedades antimicrobianas⁸³, son una mezcla de componentes orgánicos, volátiles que se originan de una fuente botánica única, y contribuyen al sabor y fragancia de una planta. Además, las plantas son capaces de sintetizar otro tipo de aceites, los denominados aceites fijos, los cuales están constituidos de ésteres de glicerol y ácidos grasos (triglicéridos o triacilglicerol) ⁸⁴. Los AEs son los mensajeros químicos que las plantas aromáticas utilizan para interactuar con su entorno y para protegerse contra amenazas medioambientales^{85,86}. Las plantas que producen AEs pertenecen a muchas especies botánicas encontradas en todo el mundo, se estima que hay alrededor de 35,000 especies de plantas y de estas, el 5% (17,500) aproximadamente son aromáticas⁸⁴.

Los AEs se pueden encontrar en diferentes partes de la planta, por ejemplo: en las hojas (eucalipto, menta), flores (rosa), frutas (limón), semillas (hinojo), hierbas (limoncillo), raíces (vetiver), rizomas (jengibre), flores (tomillo), maderas (cedro), cortezas (canela), flores de árboles (ylang-ylang), bulbos (ajo), entre otros^{84,87}. La mayoría de los aceites son líquidos, sin embargo, pueden encontrarse también en estado sólido (orris) o semisólido (guayaco) a temperatura ambiente⁸⁴. Las partes de una planta que contienen la mayor cantidad de aceite esencial son usualmente las partes que corren mayores riesgos de invasión por microorganismos como: la corteza, la savia, las hojas, las semillas y las cáscaras de las frutas^{85,86}.

Los AEs están constituidos por una mezcla de 20-200 compuestos orgánicos con estructuras químicas relacionadas⁸⁸, pero la mayoría de las veces solo uno o dos de sus constituyentes dominan su acción fisiológica⁸⁴. En cuanto al porcentaje de constituyentes, estos varían dentro de un cierto rango, esto puede deberse a diferentes factores, por

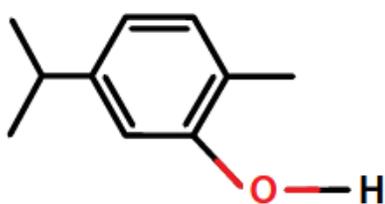
ejemplo: ubicación geográfica de la planta, condiciones climáticas, tipo de suelo, fertilizantes utilizados, edad de la planta, momento de recolección, entre otros ⁸⁴.

Los compuestos más comunes de los AEs son los terpenos que se obtienen principalmente como compuestos de hidrocarburos o los derivados de la molécula de oxígeno ⁸⁹ y, en menor medida pueden encontrarse los fenilpropanoides ⁸⁴. Los terpenos son la clase de moléculas aromáticas sintetizadas por las plantas, cada planta tiene cientos de enzimas llamadas terpeno sintasas que trabajan juntas para construir estos compuestos usando bloques más pequeños llamados unidades de isopreno, que tienen cinco carbonos ⁹⁰.

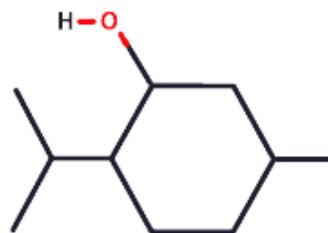
Hay tres clases principales de terpenos: ⁹⁰ monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. Los monoterpenos, formados por dos unidades de isopropeno, es decir, diez carbonos (CH_{10}) y por lo menos un enlace doble, tienden a reaccionar rápidamente al aire y al calor. Tienen fuertes efectos en las membranas celulares debido a que son lo suficientemente pequeños para caber entre las moléculas grasas que forman la membrana celular y pasar completamente por ella y afectar objetivos dentro de la célula. Los sesquiterpenos formados por tres unidades de isopropeno, es decir, quince carbonos (CH_{15}), son menos volátiles que los monoterpenos y menos prevalentes en los aceites esenciales. Tienen formas únicas que les permiten adherirse a los espacios de estructuras proteínicas tridimensionales afectando la actividad proteínica. Se conocen por activar varios receptores de la superficie celular. Los diterpenos formados por cuatro unidades de isopropeno, es decir, veinte carbonos (CH_{20}) a veces están presentes en algunos aceites esenciales, pero únicamente en cantidades muy pequeñas ⁹⁰.

Estos monoterpenos y sesquiterpenos pueden ser a su vez, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, y también oxigenados y no oxigenados ⁹¹.

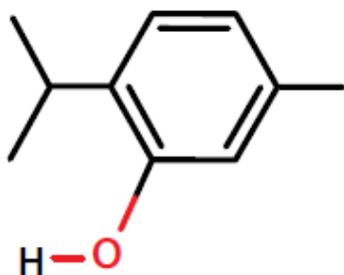
La **figura 1** muestra la estructura de los principales componentes de los aceites esenciales orégano, menta, tomillo y eucalipto.



Carvacrol (monoterpene fenol)



Mentol (monoterpene alcohol)



Timol (monoterpene fenol)



1,8 Cineol (monoterpene éter)

Figura 1. Estructura química de los componentes principales de los AE. A) Carvacrol, constituyente principal del AE orégano. B) Mentol, constituyente principal de AE menta. C) Timol, constituyente principal del AE tomillo. D) 1,8 cineol, constituyente principal del AE eucalipto.

Los métodos más comunes de extracción de AEs son:⁹⁰

- A. Destilación por arrastre de vapor:** Método más común, consiste en poner la planta a hervir en agua para crear vapor que pasa a través del material vegetal. El vapor arrastra el aceite esencial de la planta hacia un tubo de recogimiento donde el vapor se enfría y se condensa, se produce una capa de aceite y una capa de agua. El AE se separa de la capa acuosa (hidrosol, agua floral/ aromática, hidrolato) que, también contiene compuestos odoríferos, pero en concentraciones y proporciones mucho más bajas al aceite esencial. Al ser solubles en lípidos, los AEs se separan fácilmente del agua.
- B. Prensado en frío:** Este es el método de elección para extraer todos los aceites cítricos, como la naranja silvestre, el limón, la lima, la bergamota y la toronja, de la corteza. El aceite esencial de los cítricos se encuentra en pequeñas bolsas situadas

bajo la piel del fruto (pericarpio), para llevar a cabo esta técnica se utilizan prensas hidráulicas. Se raspa la superficie de la cáscara de la fruta para abrir los depósitos que contienen el AEs. Se rocía agua sobre la cáscara de las frutas y se recoge el aceite.

C. Extracción con solvente: La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. El material vegetal es lavado con el solvente para extraer por disolución los compuestos fragantes. La mezcla resultante es filtrada para sacar el material vegetal, y luego se retira el solvente mediante la destilación al vacío. El resultado de este proceso es un material espeso y ceroso que se procesa de forma similar para quedar finalmente una mezcla pura.

Los AEs son moderadamente volátiles y liposolubles, además, tienen un grado muy pequeño de solubilidad en agua. Son de aspecto fluido o espeso y de color variable según las plantas de las que esté extraído ⁸⁴⁻⁸⁶.

Algunos AEs son muy sensibles a los efectos de luz, calor, aire y humedad, por lo que, para evitar la degradación deben almacenarse lejos de la luz solar directa. Se pueden almacenar en recipientes herméticos en la oscuridad y en lugares frescos para prevenir cambios en la composición ^{84,85}.

Las propiedades antimicrobianas de los AEs han sido reportadas en diferentes estudios ⁹² y están relacionadas con la composición compleja de los aceites que son mezclas formadas por sustancias con actividad biológica diversa ⁸⁶, es decir, la interacción compleja entre las diferentes clases de compuestos tales como fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, éteres o hidrocarburos.

La interacción de los componentes de los AEs con membranas celulares microbianas permite la inhibición del crecimiento de algunas bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* las cuales, en general, son más susceptibles a los AEs que las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, estas últimas poseen una pared celular exterior hidrofílica, que ayuda a prevenir la penetración de compuestos hidrofóbicos ⁹³.

El mecanismo de acción de los AEs ha sido ampliamente estudiado, se ha propuesto que la acción antimicrobiana de los AEs se puede atribuir a su capacidad de penetrar a

través de membranas bacterianas y así interrumpir las propiedades funcionales de ésta, interactuando con los organelos que constituyen el citoplasma de la célula bacteriana e interferir en el metabolismo celular ⁹⁴.

Los AEs parecen no tener un blanco específico celular, al ser lipófilos, pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, atraviesan la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, y los permeabilizan. Esta permeabilización en la pared bacteriana está asociada con pérdida de iones y reducción del potencial de membrana, colapso de la bomba de protones y agotamiento del conjunto de ATP. El daño a la pared y membrana celular pueden conducir a fuga de macromoléculas y lisis celular ⁸⁸. También ha sido propuesto que los AEs pueden inhibir las endotoxinas de patógenos Gram negativos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de los AEs para penetrar en la biopelícula dental y ejercer un efecto bactericida ^{9,95}.

Por otra parte la naturaleza fenólica de los AEs también provoca una respuesta antimicrobiana frente a bacterias patógenas; los compuestos fenólicos interrumpen la membrana celular e inhiben las propiedades funcionales de la célula provocando la muerte celular, de la misma manera los compuestos fenólicos pueden alterar la permeabilidad celular microbiana, interferir con la generación de ATP e interrumpir la fuerza motriz de protones, que junto con la permeabilidad alterada de la membrana citoplasmática se puede provocar la muerte celular ⁹⁶.

2.7. Propiedades químicas de los aceites esenciales utilizados en el presente trabajo de investigación.

2.7.1. Aceite esencial de eucalipto.

Taxonomía ⁹⁷

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Myrtaceae*

Género: *Eucalipto*

Especie: *radiata sieber*



El árbol de Eucalipto fue descubierto en el siglo XVIII en Tasmania, forma parte de la familia de las mirtáceas y cuenta con más de 700 diferentes especies ⁹⁸. El compuesto principal es el terpeno: 1,8 cineol, también conocido como eucaliptol, sin embargo, la cantidad de este componente varía en cada especie. Son aproximadamente 18 especies del eucalipto las que han sido utilizadas para extraer AE ⁹⁸.

Los AEs de eucalipto y sus compuestos: 1,8-cineol, pineno, limoneno, piperitona, etc., han demostrado actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de microorganismos, como por ejemplo, contra patógenos asociados a enfermedades respiratorias: *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, además de patógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *Candida albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* ⁹⁹.

Debido al incremento en el interés de su aplicación como un aditivo natural para comida, cosméticos, para investigación científica y en la industria, *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus radiata* son las especies mejor conocidas con una alta demanda por los consumidores por sus propiedades antisépticas, astringentes, desinfectantes, expectorantes o como tratamiento para abscesos, artritis, asma, bronquitis, gripa, entre otras ¹⁰⁰.

Eucalyptus radiata es un gran árbol originario de Australia. Sus hojas jóvenes son sésiles, cordadas-ovadas y crecen en lados opuestos del rama, mientras que las hojas maduras son pecioladas, lanceoladas y crecen en lados alternos de la rama, generalmente presentando un tono verde más oscuro en comparación con la hoja joven. Puede llegar a medir de 30 a 50 metros de altura ¹⁰¹.

Se han identificado como principales compuestos del AE de *Eucalyptus radiata*: 1,8-cineole, α -terpineol, α -pineno y limoneno, los cuales están presentes en altas proporciones con respecto a otros compuestos ¹⁰¹. En un estudio realizado por Luís *et al.*, se detectaron 72 compuestos en el aceite *E. radiata*, sus componentes principales fueron limoneno (68.51%), α -terpineol (8.60%), α acetato de terpenilo (6.07%) y α -pineno (3.01%) ¹⁰⁰. Mientras que otros estudios han reportado que el mayor componente de *E. radiata* es 1,8-cineol ¹⁰². Sin embargo, no existe una composición exacta reportada de los compuestos principales del aceite esencial de *E. radiata*. Las diferencias entre la composición química del AE de *Eucalyptus radiata* reportadas, pueden deberse a la variación genética o factores

ambientales como el clima, estaciones de cosecha o ubicación geográfica de los especímenes analizados ¹⁰⁰.

Con respecto a sus propiedades antimicrobianas, en una investigación llevada a cabo por Luís Ângelo *et al.*, en el 2016, donde se compararon los AEs de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus radiata*, el aceite de *E. radiata* fue más efectivo contra las cepas de microorganismos analizadas: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, ya que el diámetro de las zonas de inhibición es mayor que el obtenido con el aceite de *E. globulus* ¹⁰⁰. Sin embargo, ambos aceites tenían la capacidad de extenderse sobre las placas de agar e inhibir el crecimiento de los microorganismos, particularmente las cepas de *A. baumannii*, que presentaban las zonas de mayor inhibición para ambos aceites de eucalipto. En conclusión, los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. radiata* mostraron actividad antibacteriana contra varias bacterias Gram negativas y un efecto sinérgico con varios antibióticos convencionales contra las cepas de *A. baumannii*, lo que los hace una posible alternativa a los antibióticos o desinfectantes habituales.

Un estudio realizado por Argote E. *et al.*, en 2017, tuvo como objetivo evaluar la capacidad antibacteriana de aceites esenciales de eucalipto, limón y mandarina frente a bacterias como *S. aureus* y *E. coli* ¹⁰³. En la composición del AE de eucalipto se destacaron compuestos como eucaliptol (1,8 cineol) y pineno. Se demostró que *S. aureus* fue más susceptible a diferentes tipos de aceites esenciales, mientras que *E. coli* fue más resistente a los diferentes aceites evaluados.

En el 2019, Montero M *et al.*, también evaluaron el efecto antimicrobiano *in vitro* del AE de eucalipto sobre *E. coli* y *S. aureus*, utilizándose concentraciones al 30%, 60% y 90% del AE en dilución con etanol al 96.8%. La prueba de sensibilidad antimicrobiana indicó que todas concentraciones presentaron actividad antimicrobiana en las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus*, y que las concentraciones al 30 y 60% no mostraron diferencias estadísticamente significativas ¹⁰⁴.

2.7.2. Aceite esencial de menta.

Taxonomía ¹⁰⁵

Reino: *Plantae*

División: *Espermatophyta*

Clase: *Dicotyledonae*

Orden: *Lamiales*



Familia: *Lamiaceae*

Género: *Mentha*

Especie: *piperita*

El género *Mentha* está compuesto por 19 especies geográficamente extendidas y 13 especies híbridas. La *Mentha* pertenece a la familia *Lamiaceae*, y es encontrada en regiones templadas de Asia, Sudáfrica, oeste y este de Europa, así como Turquía y Rusia. La primera aparición registrada de la planta se remonta al año 1000 a. C., cuando se encontraron hojas secas de menta sepultadas en las antiguas pirámides egipcias¹⁰⁶.

La *Mentha* se ha utilizado como planta medicinal y aromática desde tiempos antiguos, tanto en las culturas occidentales como orientales. Las especies de *Mentha* son ampliamente utilizadas en la medicina convencional, por sus efectos antiespasmódicos, antisépticos y emenagogos¹⁰⁶, además se han reportado otros usos terapéuticos en casos de malestar estomacal, como anestésico local, antiinflamatorio, diurético, antihelmíntico, antibacteriano, antifúngico y antioxidante¹⁰⁷. Sus aceites esenciales se utilizan en chicles, bebidas alcohólicas, cosméticos, perfumes, pastas dentales y enjuagues bucales. Además, la planta se usa principalmente como ensalada, especias y té, además de hierba de menta utilizada para teñir la lana¹⁰⁶.

Las plantas de menta producen diferentes AEs como aceite de menta: *M. spicata*, *M. piperita*, *M. canadensis* y aceite de poleo *M. pulegium*. La cosecha de las plantas varía de acuerdo con las estaciones del año, condiciones culturales, localización geográfica y composición genética, especies, subespecies, etc¹⁰⁷.

Mentha piperita ocurre por una hibridación espontánea entre la *Mentha spicata* y la *Mentha aquatica*, y fue descrita por Carl Linneaus en 1753¹⁰⁸. Es una planta herbácea, perenne, mide de 50-90 cm, sus tallos usualmente están ramificados. Las hojas presentan forma rectangular-ovoide¹⁰⁹, son pecioladas, lanceoladas o agudas, con bordes aserrados de color verde oscuro en la cara superior y más clara en el inferior, formando nudos de los que surgen ramificaciones del tallo. Sus flores están agrupadas en tirso densos, color púrpura. Los estolones son de sección cuadrangular y crecen bajo y sobre la superficie del suelo en todas direcciones¹¹⁰. Originaria de Europa, pero se puede encontrar en diferentes partes del mundo, con climas de preferencia templados. Es una planta que puede ser cultivada en huertos, jardines o campos, crece espontáneamente en tierras profundas y con bastante humedad¹¹⁰.

En el conjunto de toda la planta, se puede obtener el AE, el cual es un líquido incoloro, con olor fuerte y sabor picante, que se halla localizado en pequeñas glándulas situadas en la superficie superior e inferior de las hojas, los tallos contienen menor proporción del aceite ¹¹¹, los extractos de la menta se deben proteger de la luz.

El aceite esencial en las hojas secas de menta está compuesto principalmente de mentol (50%), mentona (10 a 30%), ésteres de mentilo (hasta 10%) y otros derivados de monoterpeno. La composición química de *M. piperita* se caracteriza por la presencia de monoterpenos oxigenados como mentol, mentona, acetato de mentilo, hidrato de sabineno, mentofurano y 1,8 cineol ¹⁰⁶. Ha sido reportado que el mentol es el responsable de la actividad antibacteriana de *M. piperita*, sin embargo, la actividad antimicrobiana, como muchas otras actividades biológicas, está estrechamente relacionada con la variabilidad en la composición química del aceite esencial presente en diferentes genotipos y especies del género *Mentha* ¹⁰⁶.

Se ha reportado que el aceite esencial de *M. piperita* exhibe una fuerte actividad inhibitoria contra una amplia gama de bacterias patógenas humanas Gram positivas y Gram negativas y hongos ¹⁰⁶, además de que los componentes de este AE: 1, 8-cineol, dihidrocarvona, limoneno, fitol, linalool, timol, carveol, piperitona y eugenol, presentan propiedades antioxidantes ¹¹².

En un estudio donde se evaluó la actividad antimicrobiana de los AEs de *M. piperita* y *M. spicata*, se reportó que ambos aceites contenían mentol y carvona como componentes principales, y que ambos AEs mostraron una buena actividad antibacteriana contra los microorganismos *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes* y *C. albicans*, sin embargo, no mostraron actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* ¹⁰⁶.

Mamani realizó un estudio donde determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Mentha spicata* a concentraciones del 25%, 50% y 100% sobre flora bacteriana salival. Las muestras de saliva fueron obtenidas de 15 sujetos seleccionados aleatoriamente. Como control positivo se usó clorhexidina 2 % y como control negativo alcohol etílico de 96°. Se concluyó que el aceite esencial de menta al 25% no presenta actividad antibacteriana, sin embargo, hubo actividad inhibitoria positiva en las concentraciones de 50 y 100 % sin diferencia significativa entre ellas ¹¹³.

2.7.3. Aceite esencial de orégano.

Taxonomía ¹¹⁴

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae (Labiatae)*

Género: *Origanum*

Especie: *vulgare*



El orégano es una especie herbácea mediterránea de la familia *Lamiaceae*, planta perenne aromática con raíces fibrosas, generalmente de 30-60 cm de altura en algunas especies y en otras de más de 100 cm. Los tallos tienen cuatro ángulos, como en otras especies de *Lamiaceae*. Comprende varias subespecies como *hirtum*, *vulgare*, *viridulum*, *viride* ¹¹⁵. Aproximadamente el 75% de todas las especies de *Origanum* solo se encuentran en la región del Mediterráneo oriental.

La planta de *Origanum vulgare*, es un pequeño arbusto perenne, tupido, rizomatoso. Sus tallos son erectos, de unos 90 cm o más, generalmente ramificados en la parte superior, sus hojas son simples, fragantes y de forma redondeada a ovada, produce flores diminutas, de color púrpura rosado o blanco ¹¹⁶. La planta de orégano desprende un aroma agradable y especial, crece mejor en humedad seca a media y en suelos bien drenados. Se encuentra naturalmente en algunas partes de Europa, centro y norte de Asia y América del Norte. Fue introducida en el siglo XVI, procedente de Oriente Medio ^{114,117}.

Se sabe que la mayoría de las especias, principalmente las que pertenecen a la familia *Lamiaceae*, poseen una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas. Desde la antigüedad se han utilizado para mejorar el sabor y las propiedades organolépticas de diferentes tipos de alimentos ¹¹⁸. El AE de orégano tiene un gran valor comercial, ya que se emplea como especia, condimento, en la industria de los perfumes, jabones, cosméticos o como aromatizante. En medicina se ha aconsejado su aplicación como vendaje para calmar fuertes dolores de cabeza o para calmar el dolor dental ¹¹⁹.

Los componentes principales del aceite de orégano varían según la región de procedencia, generalmente contiene como principios activos carvacrol y timol, llegando hasta el 80% y el 64%, respectivamente, además de contener precursores de los

monoterpenos: p-cimeno y γ -terpineno, en una proporción menor ¹²⁰. Acevedo *et al.*, determinaron los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *O. vulgare*, obteniendo una mayor concentración del timol, sin embargo, esto puede variar según las condiciones de su crecimiento como suelo, clima o las condiciones climáticas ¹²¹. Además, se pueden encontrar sesquiterpenos (b-cariofileno y b-bisaboleno); linalol y terpinen-4-ol, polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos), triperpenoides y esteroides ¹¹⁵.

Debido a su alto contenido de fenoles, se debe tener cuidado al inhalar o difundir, solo se necesitan de 1-2 gotas.

El efecto antimicrobiano del aceite de orégano se debe a sus componentes principales, el carvacrol y timol, su espectro antimicrobiano es amplio, incluye a bacterias como *S. aureus* resistente a meticilina, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus carvatus* y *Lactobacillus sakei*, hongos: *Aspergillus* sp. y *Candida* sp., y parásitos: *Blastocystis hominis*, *Entamoeba hartmanni*, y *Endolimax nana* ¹²⁰.

Los AEs obtenidos de las diferentes especies de orégano presentan actividad contra bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se ha sugerido que los fenoles que posee este aceite esencial (carvacrol y timol) poseen niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, siendo el timol el más activo ¹²².

El timol es una sustancia cristalina incolora que se encuentra presente en la naturaleza de aceites esenciales como el orégano o tomillo, se considera uno de los agentes microbianos más activo de los componentes de los AEs, su composición química es muy parecida a la de carvacrol, únicamente cambia la posición del grupo hidroxilo. Se reporta que su mecanismo de acción consiste en alterar la estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, lo que facilita la liberación de lipopolisacáridos y aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática. El timol pertenece al grupo de los terpenos y un isómero del timol es el carvacrol, se ha sugerido que el carvacrol en los diferentes quimiotipos de *O. vulgare* es variable y puede ser del 60 hasta el 95% ¹²⁰.

En un estudio donde se evaluaron cinco aceites esenciales (extraídos de plantas perteneciente a la familia *Lamiaceae*) contra seis bacterias Gram positivas (incluyendo *S. aureus*) y 9 Gram negativas (entre ellas *E. coli*), el aceite de orégano mostró un gran efecto bacteriostático y bactericida, probablemente debido a su alto contenido en compuestos

fenólicos, en comparación con los aceites de salvia, menta, manzanilla y aceites de hisopo, que presentaron un efecto más débil y solo bacteriostático ¹²³.

Albado E, y cols., determinaron la actividad antimicrobiana en el aceite esencial de *O. vulgare* sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*, las cuales mostraron diferentes grados de sensibilidad. Los autores concluyeron que el AE *O. vulgare* posee actividad antimicrobiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *Pseudomonas aeruginosa* ¹²⁴.

Bastos M y cols., evaluaron la concentración mínima bactericida del AE *O. vulgare* contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los autores encontraron que, aunque el AE *O. vulgare* no presentó efecto inhibitorio en *P. Aeruginosa*, si mostró actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus* ¹²⁵.

Por otro lado, Pimentel *et al.*, en el 2015 realizaron un estudio *in vitro* evaluando la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *O. vulgare* al 100%, comparado con clorhexidina al 0.12% contra *Lactobacillus acidophilus* y *Porphyromonas gingivalis*. El extracto demostró un mayor efecto inhibitorio en las cepas *Lactobacillus acidophilus* y *Porphyromonas gingivalis* en comparación con clorhexidina al 0.12% ¹²⁶.

Otro estudio *in vitro* determinó el efecto inhibitorio del aceite esencial de *O. vulgare*, comparado con clorhexidina al 0,12% contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Los resultados mostraron que el AE *O. vulgare* al 100% tuvo el mismo efecto inhibitorio frente al crecimiento de cepas de *A. actinomycetemcomitans* que la clorhexidina al 0,12% ¹²⁷.

2.7.4. Aceite esencial de tomillo.

Taxonomía ¹²⁸

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Género: *Thymus*

Especie: *vulgaris*



El tomillo es una planta originaria del Mediterráneo, se ha adaptado a muchos climas diferentes en todo el mundo, también crece en estado silvestre en Estados Unidos,

Canadá, Chile, Australia o Nueva Zelanda ^{129, 130}. El tomillo pertenece a la familia *Lamiaceae*, existen diferentes especies, entre las más representativas está *Thymus serpyllum* y *Thymus vulgaris* ¹²⁰.

Hasta ahora se han identificado 928 especies del género *Thymus* en Europa, África del Norte, Asia, América del Sur y Australia ¹²⁰. El género *Thymus* es de clima templado y originario de los países de la cuenca mediterránea occidental. Crece en suelos secos y soleados, resiste bien las heladas y sequías, es una planta aromática, leñosa, de 10-40 cm de altura y muy ramificada, sus hojas de 3-8 mm son lineares, oblongas. Es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su aceite esencial, en el que ya se han detectado 7 quimiotipos ^{128,131}.

El aceite esencial de *T. vulgaris* puede contener hasta 30 monoterpenos ¹²⁰. Principalmente este AE está constituido por fenoles monoterpénicos como timol (10–64%), carvacrol (0.4–20.6%), p-cimeno (9.1–22.2%), γ -terpineno, limoneno, borneol (0.6–7.5%), linalool (2.2–4.8%), 1,8-cineole (0.2–14.2%), α -pinene (0.9–6.6%) ¹³². El AE también contiene flavonoides, como luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol, cirsilineol, salvigenina, cirsimaritina, timonina y timusina, entre otros. Otros componentes también destacables son los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ácidos cafeico y rosmarínico), triterpenos (ácidos ursólico y oleanólico), saponinas, taninos y un principio amargo (serpilina) ¹³¹.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la composición del AE es variable según la época y lugar de la cosecha, por este motivo, la Farmacopea Francesa exige que la esencia tenga un mínimo del 30% de fenoles totales, entre ellos, los principales son el timol y el carvacrol ¹³¹.

En el siglo XIX y primera mitad del XX, cuando todavía no se conocían los antibióticos, el tomillo era considerado como un eficaz desinfectante ¹³³. Sus componentes fenólicos (timol y carvacrol) tienen actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivos y Gram negativos ya que actúa sobre la membrana de éstas. Además, también tiene acción antifúngica (contra *Candida albicans*) y antivírica. Se han reportado diferentes estudios que validan el efecto antibacteriano *in vitro* de este AE, además de su actividad antifúngicas en algunos patógenos como *Candida albicans* ¹³⁴.

Borugá O *et al.*, reportan que la actividad antimicrobiana del AE de tomillo está relacionado con la presencia de sus componentes fenólicos (timol) e hidrocarburos terpénicos (γ -terpineno). El p-cimeno, que es el tercer elemento principal según el

porcentaje mostrado en su estudio, no muestra eficacia antibacteriana cuando se usa solo, sin embargo, se le atribuyen efectos sinérgicos en relación con el timol y el γ -terpineno, respectivamente, que podrían representar otra causa de la actividad antimicrobiana registrada. El efecto inhibitorio de este AE se probó en 7 bacterias y hongos comunes relacionados con los alimentos: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* y *Candida albicans*, utilizando el método de difusión en agar. Los resultados demostraron la efectividad del tomillo contra las bacterias y hongos evaluados en dicho estudio ¹³⁵.

En un estudio *in vitro*, se determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra la cepa de *P. gingivalis* mediante el método de difusión en agar, en el cual se observó que la concentración mínima inhibitoria de *Porphyromonas gingivalis* fue de 0,31 mg/ml, mientras que la concentración mínima bactericida fue de 0,37 mg/ml ¹²⁸.

Otro estudio que evaluó 21 aceites esenciales y cinco bacterias patógenas demostró que los aceites esenciales de tomillo, laurel, canela y clavo tenían los efectos bacteriostáticos y bactericidas más potentes contra *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* ¹³⁶.

Además, en otra investigación se evaluaron los hidrosoles (agua aromática) de tres especies de Orégano: *O. vulgare*, *O. onites*, *O. majorana*, y de dos especies de Tomillo: *T. vulgaris*, *T. serpyllum*, contra las bacterias *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* observándose que la bacteria *S. aureus* la más sensible a todos los hidrosoles ¹³⁷.

El efecto antimicrobiano del AE de tomillo, como se ha mencionado, es atribuido al carvacrol y timol, y su espectro antimicrobiano es amplio, incluyendo bacterias como *Aeromonas* sp., *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* resistente a metilicina, *S. epidermidis*, *S. enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *K. pneumoniae*, *Shigella* sp., *Campylobacter jejuni*, y *P. aeruginosa*, además de hongos como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *dermatophytes*, *Fusarium* sp., y *Aspergillus* sp. ¹²⁰.

Tabla 1. Se muestra la estructura molecular, constituyentes principales, además del efecto antimicrobiano reportado para cada uno de los AE evaluados en el presente trabajo.

Aceite esencial	Estructura molecular	Constituyentes principales ¹³⁸	Efecto antimicrobiano ^{139 140}
Eucalipto (<i>Eucalyptus radiata</i>)	Monoterpeno	1,8-cineol Limoneno Terpineol Acetato de terpenilo Piperitona α pineno	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Menta (<i>Mentha piperita</i>)	Monoterpeno	Mentol Mentona Acetato de mentilo Mentofurano	<i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> .
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Monoterpeno	Carvacrol Timol γ -terpineno Terpinen-4-ol monoterpenos sabinyl	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Blastocystis hominis</i> , <i>Entamoeba hartmanni</i> , <i>Endolimax nana</i> .
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Monoterpeno	Timol <i>p</i> -cimeno γ -terpineno Linalool	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Propionibacterium acnés</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>dermatofito</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> .

Tabla 2. Se muestra un resumen de los principales usos reportados para cada uno de los AE evaluados en el presente trabajo.

Eucalipto ^{100,101}	Menta ^{108,119,141-143}	Orégano ^{117,118,144,145}	Tomillo ^{119,131-134}
<i>Eucalyptus radiata</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiséptico. ▪ Antimicrobiano. ▪ Antiviral. ▪ Antiinflamatorio. ▪ Antitusivo. ▪ Mucolítico. ▪ Expectorante. ▪ Astringente. ▪ Desinfectante. ▪ Utilizado en condiciones dentales como gingivitis. ▪ En aromaterapia es usado independiente o combinado con otros aceites esenciales. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiséptico. ▪ Antibacteriano. ▪ Antiviral. ▪ Antifúngico. ▪ Antiparasitario. ▪ Antieméticos. ▪ Tranquilizante. ▪ Insecticida. ▪ Antiespasmódico a nivel del músculo liso del tracto gastrointestinal. ▪ Ha sido utilizado junto con otros aceites volátiles para aliviar dolor de cabeza. ▪ Promueve la función respiratoria saludable y la respiración despejada. ▪ Se utiliza en pasta de dientes y goma de mascar para la salud oral. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiséptico. ▪ Antibacteriano. ▪ Antiviral. ▪ Antifúngico. ▪ Antiinflamatorio. ▪ Analgésico. ▪ Cicatrizante (uso externo). ▪ Insecticida. ▪ Expectorante. ▪ Antiespasmódico. ▪ Digestivo. ▪ Carminativo. ▪ Antioxidante. ▪ Ayuda en afecciones de las vías respiratorias como faringitis, bronquitis, toses espasmódicas o asma. ▪ Como especia, condimento. ▪ En la industria de los perfumes, jabones, cosméticos o como aromatizante. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiséptico (Al eliminarse por vía respiratoria y renal, el tomillo produce también efecto antiséptico en el árbol respiratorio y en las vías urinarias). ▪ Antibacteriano. ▪ Antiviral. ▪ Antifúngico. ▪ Antiinflamatorio. ▪ Antitusivo. ▪ Expectorante. ▪ Mucolítico. ▪ Insecticida. ▪ Antiespasmódico. ▪ Ayuda en afecciones de las vías respiratorias altas (tos irritativa, laringitis, bronquitis, asma, enfisema, tos ferina y gripe). ▪ Antihelmíntico. ▪ Condimento.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La biopelícula dental constituye el factor etiológico fundamental en el desarrollo de las dos enfermedades orales de mayor prevalencia a nivel mundial: la caries y la enfermedad periodontal, por lo que es importante establecer estrategias que permitan un control de la biopelícula dental para evitar el crecimiento de comunidades microbianas que afecten el estado de salud oral. Existen muchos enfoques destinados en reducir la

acumulación de la biopelícula dental, desde la restricción de azúcares en la dieta hasta métodos mecánicos y químicos, estos últimos son utilizados como coadyuvantes de la higiene oral mecánica. El uso de agentes antimicrobianos en enjuagues bucales o pastas dentífricas se han considerado auxiliares útiles en la prevención del crecimiento de la biopelícula dental. Actualmente, existen en el mercado diferentes antisépticos orales que contribuyen al control de la biopelícula dental, sin embargo, la mayoría de estos agentes antisépticos producen diversos efectos adversos como tinción en dientes, alteraciones del sentido del gusto, entre otras. Debido a esto, en la práctica clínica odontológica persiste una necesidad de obtener nuevos productos que inhiban o detengan el crecimiento de microorganismos asociados con el desarrollo de enfermedades en la cavidad oral y que posean menor efectos adversos para ser utilizados por los pacientes en el tratamiento de enfermedades orales.

4. JUSTIFICACIÓN

Bajo condiciones normales los microorganismos presentes en la cavidad oral viven en equilibrio mientras las condiciones externas son constantes, sin embargo, si se produce un desequilibrio, este puede repercutir en la salud oral y generar la aparición de afecciones, entre las cuales se encuentra la enfermedad periodontal, por esta razón, es de gran importancia el enfoque en el control de la biopelícula dental para prevenir el desarrollo de enfermedades orales. Uno de los tratamientos utilizados para esta enfermedad son los enjuagues orales, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, estos poseen diversos efectos adversos al utilizarlos por largo plazo.

Actualmente se buscan nuevas alternativas que sean naturales, eficaces y de bajo costo con respecto a agentes antisépticos químicos existentes en el mercado. Se ha reportado que los aceites esenciales poseen una alta actividad antimicrobiana y pueden ser un método alternativo para el tratamiento de algunas afecciones, por lo que en el presente trabajo se considera relevante evaluar la actividad antibacteriana de los AEs de eucalipto, menta, orégano y tomillo en bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal y peri-implantar.

5. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus radiata*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) tienen efecto antibacteriano sobre las cepas bacterianas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus radiata*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre las cepas bacterianas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

6.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus radiata*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) a una concentración del 100% sobre las cepas bacterianas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus radiata*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) a una concentración del 50% sobre las cepas bacterianas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

7. MATERIALES

7.1. Recursos humanos.

- Tutora de tesis.
- Tesista estandarizada para el manejo de los equipos de laboratorio y realización de pruebas microbiológicas.

7.2. Recursos materiales para el cultivo de microorganismos.

- Cajas de Petri con agar TSA.
- Cajas de Petri con agar HK.
- Caldo de cultivo TSA.
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL.
- Tubos Eppendorf de 1.5 µL.
- Autoclave.
- Micropipetas de 10, 20 y 200 µL.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Espectrofotómetro Eppendorf.
- Cámara de anaerobiosis.
- Incubadora Felisa a 35°.

7.3. Recursos para las pruebas de inhibición bacteriana.

- Cajas de Petri con agar TSA.
- Cajas de Petri con agar HK.
- Caldo de cultivo TSA.
- Espectrofotómetro Eppendorf.
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL.
- Tubos Eppendorf de 1.5 µL.
- Micropipetas de 10, 20 y 200 µL.
- Mechero de gas.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo (doTERRA, CPTG Certified Pure Tested Grade™).
- Discos de papel Whatman.
- Cámara de anaerobiosis.
- Incubadora Felisa a 35°.
- Analizador de imágenes aColyte 3, Symbiosis.

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

La **tabla 3** presenta los compuestos probados en este estudio.

ACEITE ESENCIAL
Eucalipto
Menta
Orégano
Tomillo

Clorhexidina (CHX) al 0.12%, considerada el estándar de oro de los antisépticos orales ^{7,8}, fue utilizada como control positivo en el presente estudio, además, se utilizaron dos enjuagues comerciales como referencia, Listerine[®], a base de aceites esenciales y Blue[®]M, el cual es referido por el fabricante como un antiséptico oral enfocado en el control de la biopelícula dental alrededor de implantes dentales de titanio.

La **tabla 4** presenta las características de las especies bacterianas que fueron utilizadas como referencia para la evaluación del efecto antibacteriano de los diferentes AEs, en el presente trabajo.

ESPECIE	ATCC*	GRAM	RESPIRACIÓN	ASOCIADO
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	43718	-	Anaeróbica	Periodontitis.
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43636	-	Aeróbica	Infecciones asociadas con dispositivos biomédicos/ Infecciones oportunistas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+		

* American Type Culture Collection, Rockville, MD

8.1 Cultivo de microorganismos.

Las especies bacterianas empleadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana provienen de cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). En el caso de las especies anaeróbicas, las especies crecieron en agar enriquecido HK (agar soya Trypticase, con agar cerebro-corazón y levadura) en una cámara de anaerobiosis durante 7 días. Mientras que, las especies aeróbicas crecieron en agar enriquecido TSA (Trypticase soy agar) en una incubadora a 35°C durante 24 a 48 horas.

Las cepas liofilizadas *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, se sembraron sobre agar HK, posteriormente se llevaron a una cámara de anaerobiosis en condiciones atmosféricas de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂, durante 7 días. Las cepas liofilizadas *P. aeruginosa* y *S. aureus* se sembraron sobre el agar TSA, se utilizó un asa de alambre estéril, posteriormente, las placas fueron llevadas a una incubadora a 35°C durante 24 horas.

8.2. Pruebas de antibiogramas.

De cada cepa en cultivo puro, se recolectó el crecimiento de la superficie del agar y se colocó en tubos con caldo enriquecido HK (caldo soya Trypticase, con infusión cerebrocorazón), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina para las cepas anaeróbicas. Las cepas aeróbicas, fueron suspendidas en tubos con caldo TSB enriquecido (caldo soya Trypticase) suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/ml de hemina.

Posteriormente, se ajustó la densidad óptica (OD) de cada tubo a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm para obtener el mismo número de células/mL en cada ensayo. De la solución ajustada a OD=1 de cada cepa bacteriana, se transfirieron 100 µL en las cajas de petri con agar enriquecido HK o TSA, según el tipo de microorganismo y se esparcieron de manera homogénea en la superficie del agar, por medio de la técnica de sembrado en pasto.

Una vez esparcida la suspensión de los microorganismos, se colocaron discos de papel Whatman embebidos con 3 µL de las siguientes sustancias: aceite esencial al 100% (eucalipto, menta, orégano y tomillo), cada uno de estos en una caja de Petri diferente, enjuague oral Blue[®]M, Listerine[®], CHX al 0.12% (controles positivos) y medio de cultivo líquido (control negativo).

Posteriormente, en otras cajas de Petri, se colocaron los discos embebidos con 3 μ L de aceite esencial (eucalipto, menta, orégano y tomillo) diluido al 50% con aceite de olivo, enjuague oral Blue[®]M, Listerine[®] y clorhexidina al 0.12%, como controles positivos, aceite de olivo al 100% y medio de cultivo líquido (control negativo). La disposición de los discos se muestra en la **figura 2**.

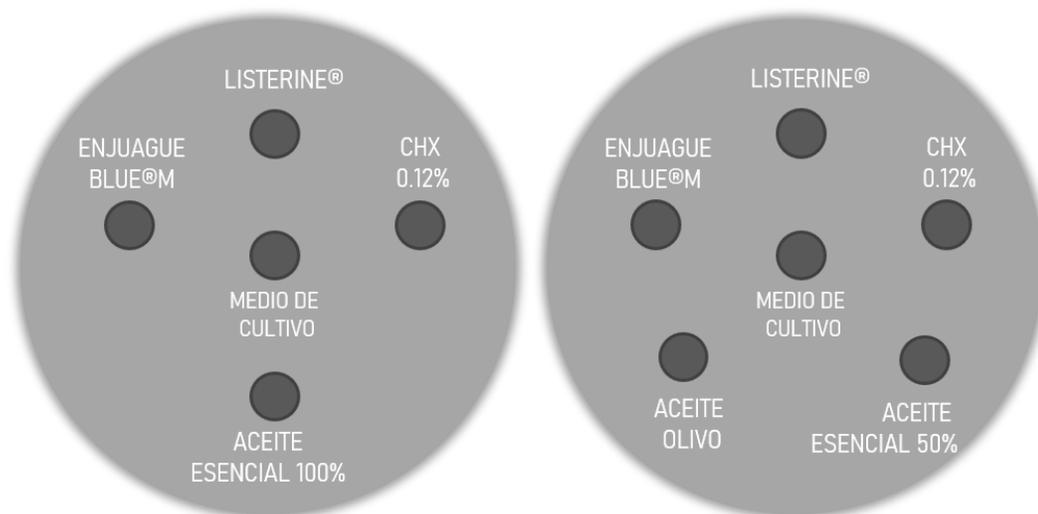


Figura 2. Disposición de los discos en el antibiograma.

Las cajas de Petri sembradas con sus respectivos discos se incubaron durante 7 días bajo condiciones de anaerobiosis en el caso de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Y las cajas con las cepas *P. aeruginosa* y *S. aureus* se incubaron durante 24 horas bajo condiciones de aerobiosis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el examen visual para la medición de los halos de inhibición asociados a cada compuesto probado en cada caja de Petri.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación adecuado para cada tipo de microorganismo, se realizó el examen visual de los halos de inhibición presentes en cada una de las cajas de Petri. La medición de cada uno de los halos de inhibición fue registrada en milímetros (mm) utilizando el analizador de imágenes aColyte 3, Symbiosis.

8.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo tomando en cuenta el diámetro de cada uno de los discos mediante la prueba de ANOVA, y las diferencias significativas se determinaron utilizando la modificación de Bonferroni.

9. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad antimicrobiana de cada uno de los aceites esenciales (AE) sobre las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

9.1. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

En la **figura 3** se muestran los resultados obtenidos a partir de las pruebas de antibiograma llevadas a cabo para la evaluación del efecto antibacteriano de los diferentes AE sobre la cepa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Se observó que el AE de orégano mostró el mayor efecto antibacteriano sobre la cepa *A. actinomycetemcomitans* ($15.1 \pm 1.0\text{mm}$) (media \pm DS), seguido del efecto antibacteriano obtenido por el AE de tomillo, el cual mostró con un halo de inhibición de $7.4 \pm 0.0\text{mm}$, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos AEs ($p < 0.05$). Los AEs de eucalipto y menta mostraron un efecto antibacteriano significativamente menor en comparación con el efecto antibacteriano observado con el AE de orégano ($p < 0.001$). Los halos de inhibición mostrados por los AEs de menta y eucalipto fueron de $1.2 \pm 0.3\text{mm}$ y $1.9 \pm 0.2\text{mm}$, respectivamente; siendo estas diferencias no estadísticamente significativas entre ellas (NS).

Se observó que todos los AEs evaluados mostraron un efecto antibacteriano igual o mayor al efecto inhibitorio logrado con el control positivo, clorhexidina (CHX) al 0.12%. Al respecto, se encontró que la inhibición bacteriana lograda por los AEs de orégano y tomillo fue estadísticamente mayor a la observada con el estándar de oro (CHX), $p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente.

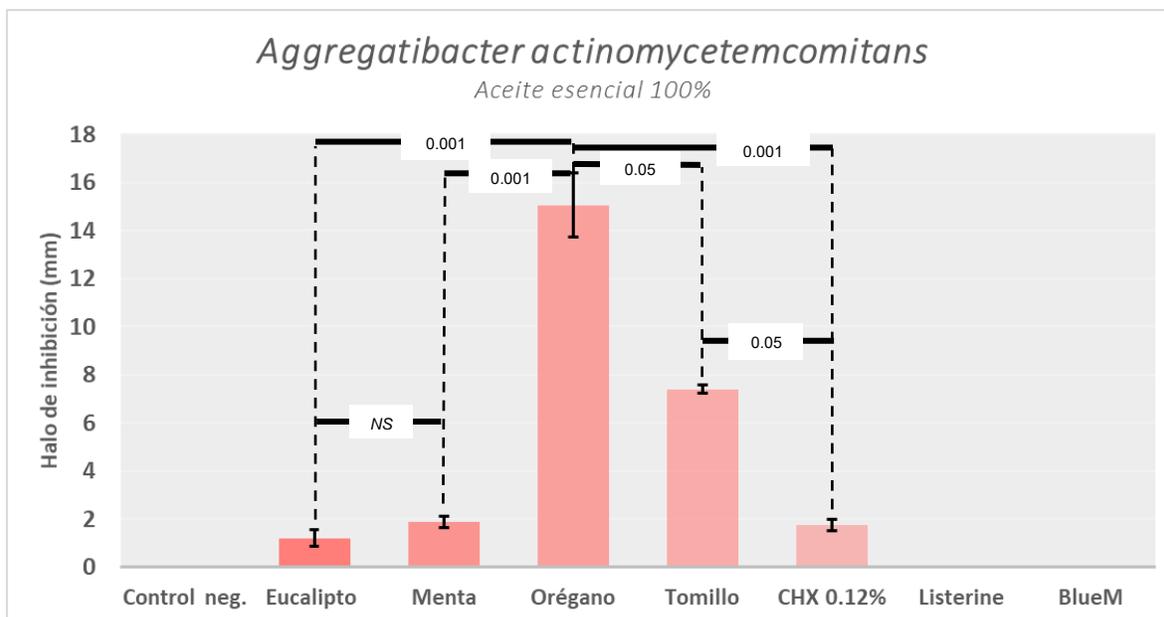


Figura 3. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Por otro lado, cuando se evaluó el efecto antibacteriano de los AEs de eucalipto, menta, orégano y tomillo diluidos al 50%, sobre el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (**figura 4**), se encontró que los halos de inhibición mostrados por los todos AEs fueron menores, e incluso los AEs de menta y eucalipto perdieron su efecto antibacteriano al ser diluidos al 50%. Como se puede observar en la **figura 4**, el aceite de orégano sin diluir produjo un halo de inhibición de $15.1 \pm 1.0\text{mm}$ sobre la cepa bacteriana *A. actinomycetemcomitans*, y al ser diluido al 50% el halo de inhibición se redujo a $6.3 \pm 0.9\text{mm}$. De forma similar, se observó que el AE de tomillo disminuyó su capacidad inhibitoria al ser diluido al 50%, mostrando un menor halo de inhibición ($3.4 \pm 0.2\text{mm}$), en comparación del halo de inhibición observado con el AE de tomillo sin diluir ($7.4 \pm 0.0\text{mm}$). Los AEs de eucalipto y menta perdieron su efecto antibacteriano cuando fueron diluidos al 50%.

En la **figura 4** se observa que el AE de orégano diluido al 50% fue el AE con mayor halo de inhibición ($6.3 \pm 0.9\text{mm}$), dicha inhibición fue estadísticamente significativa con respecto al halo de inhibición observado con el AE de tomillo ($3.4 \pm 0.2\text{mm}$) ($p < 0.05$). También se puede observar que incluso diluidos al 50% los AEs de orégano y tomillo tuvieron un efecto antibacteriano significativamente mayor al observado en el control positivo CHX al 0.12%, $p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente.

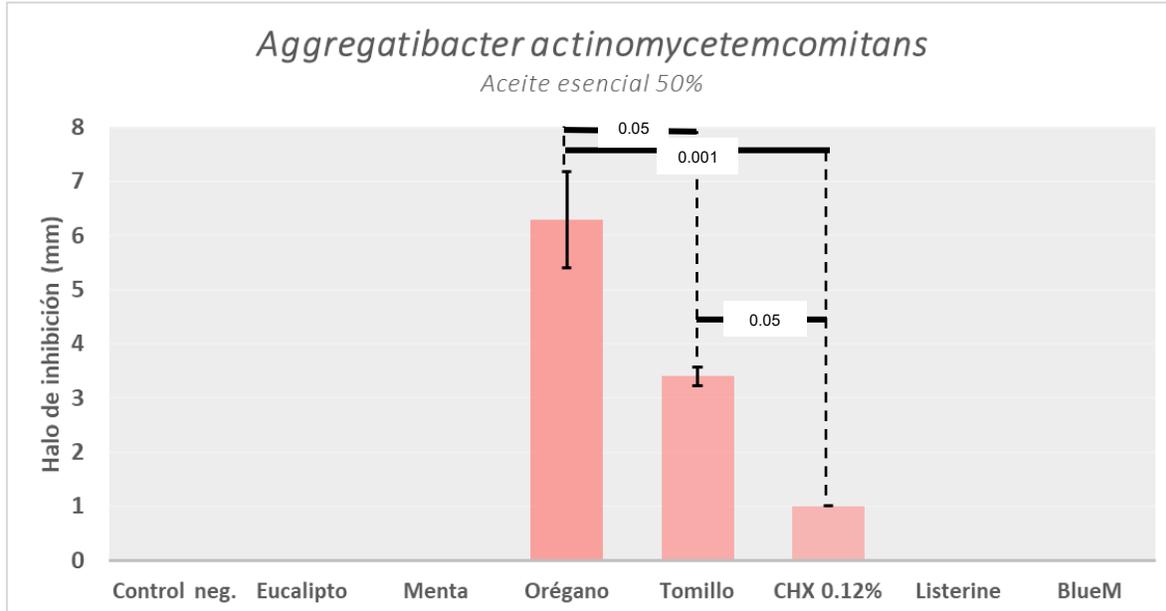


Figura 4. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) diluidos al 50% sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

9.2. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana *Porphyromonas gingivalis*.

En la **figura 5** se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antibacteriano de los AEs de eucalipto, menta, orégano y tomillo sin diluir sobre el crecimiento la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis*. Se observa que, de forma similar a lo observado con la cepa bacteriana *A. actinomycetemcomitans*, el AE de orégano mostró un halo de inhibición significativamente mayor ($14.3 \pm 0.6\text{mm}$) al logrado por el AE de tomillo ($5.8 \pm 0.4\text{m}$) ($p < 0.01$), e incluso significativamente mayor que el halo de inhibición logrado por el control positivo (CHX al 0.12%) ($p < 0.001$). El menor efecto antibacteriano fue observado con la utilización de los AEs de eucalipto ($1 \pm 0.0\text{mm}$) y menta ($1.1 \pm 0.2\text{mm}$), sin observarse una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto inhibitorio de ambos AEs (*NS*). Es importante mencionar, que el efecto antibacteriano observado en los AEs de eucalipto y menta fue menor al observado en el control positivo CHX al 0.12% ($2.3 \pm 0.6\text{mm}$), Sin embargo, ésta diferencia no fue estadísticamente significativa (*NS*).

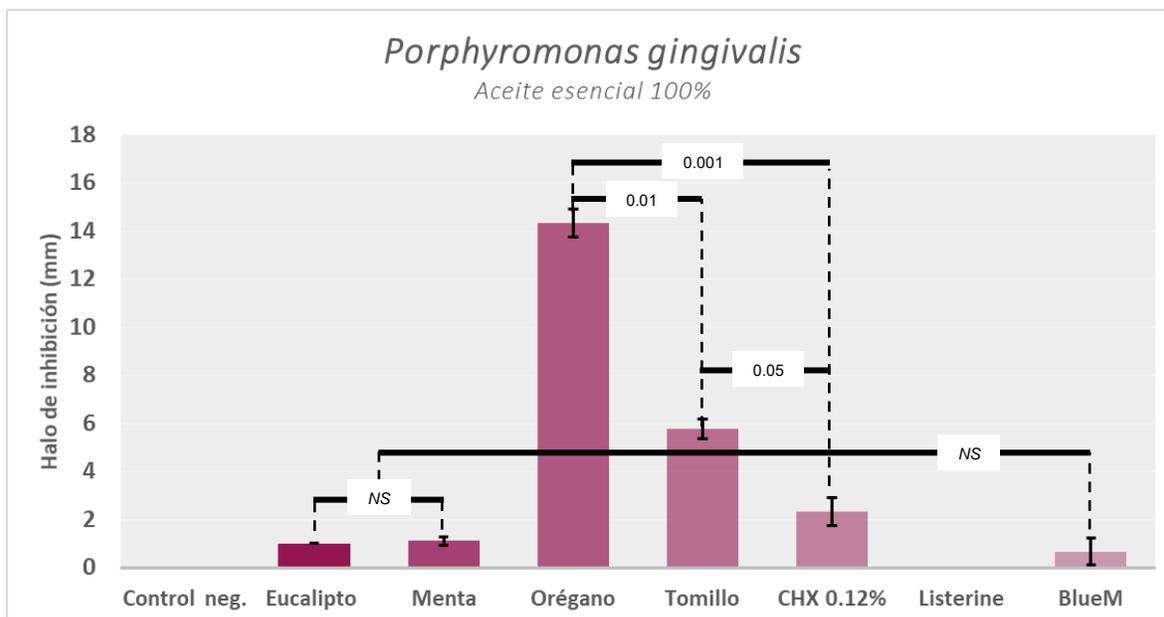


Figura 5. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) evaluados en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

En la **figura 6** se pueden observar los resultados de la evaluación del efecto antibacteriano de los AEs de eucalipto, menta, orégano, tomillo diluidos al 50% sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis*. Con base en los resultados obtenidos, se comprueba que los AEs evaluados en el presente trabajo, al ser diluidos al 50%, disminuyen su efecto antibacteriano, como sucede con los AEs de orégano y tomillo, o incluso pierden por completo su efecto inhibitorio (eucalipto y menta) sobre el crecimiento de la bacteria *P. gingivalis*.

Nuevamente, el AE de orégano mostró el mayor efecto inhibitorio sobre la cepa bacteriana *P. gingivalis* (4.6 ± 0.7 mm), seguido del efecto antibacteriano logrado por el AE de tomillo, el cual tuvo un halo de inhibición de 2.4 ± 0.9 mm, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Además, la inhibición bacteriana lograda por el AE de orégano fue significativamente mayor a lo observada en el control positivo CHX al 0.12% (3 ± 0.0 mm) ($p < 0.05$). Mientras que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el efecto antibacteriano observado con el AE de tomillo (2.4 ± 0.9 mm) y el grupo de CHX al 0.12% (NS).

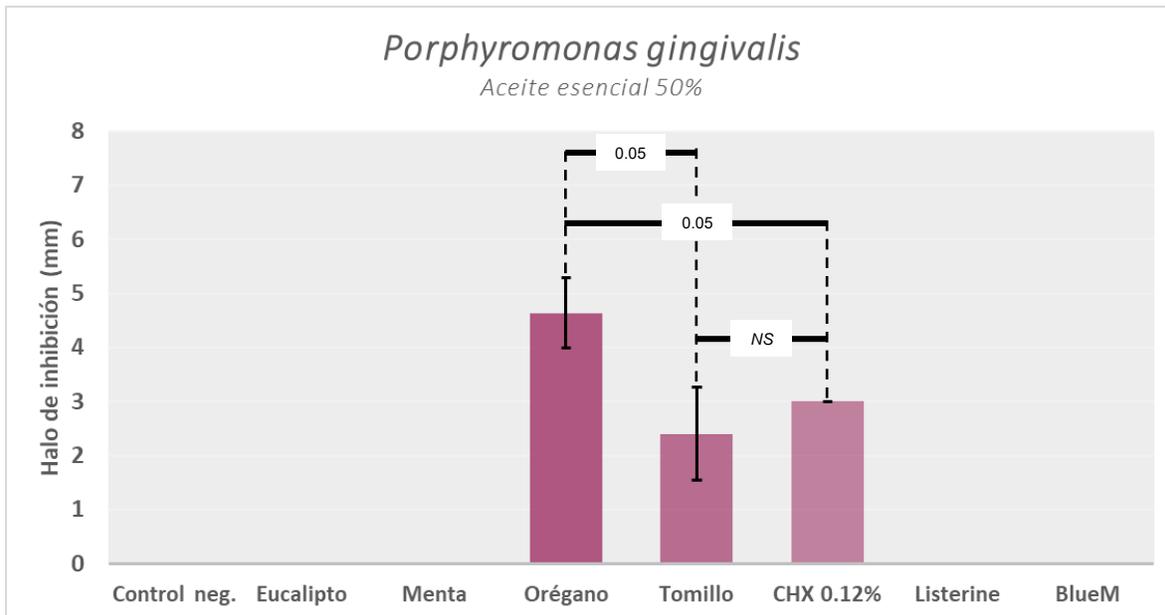


Figura 6. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) diluidos al 50% sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis*.

9.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*.

La **figura 7** muestra los resultados obtenidos de la evaluación antibacteriana de los diferentes AEs (eucalipto, menta, orégano y tomillo) sobre el crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*. A diferencia de los observado con las *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, la cepa bacteriana *P. aeruginosa* mostro mayor sensibilidad al AE de tomillo, el cual produjo un halo de inhibición significativamente mayor ($7 \pm 1\text{mm}$) en comparación con el halo de inhibición logrado por el AE de orégano ($1.8 \pm 0.7\text{mm}$), $p < 0.01$. El efecto inhibitorio del AE de tomillo fue también significativamente mayor al efecto antibacteriano observado con el grupo de CHX al 0.12% ($3.2 \pm 0.5\text{mm}$), $p < 0.05$. Mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el efecto antibacteriano logrado por el AE de orégano en comparación con el efecto inhibitorio observado en el grupo de CHX al 0.12% (*NS*).

Finalmente, la cepa bacteriana *P. aeruginosa* se mostró resistente al efecto inhibitorio de los AEs de eucalipto y menta, así como también mostró resistencia a los controles positivos: Blue[®]M y Listerine[®].

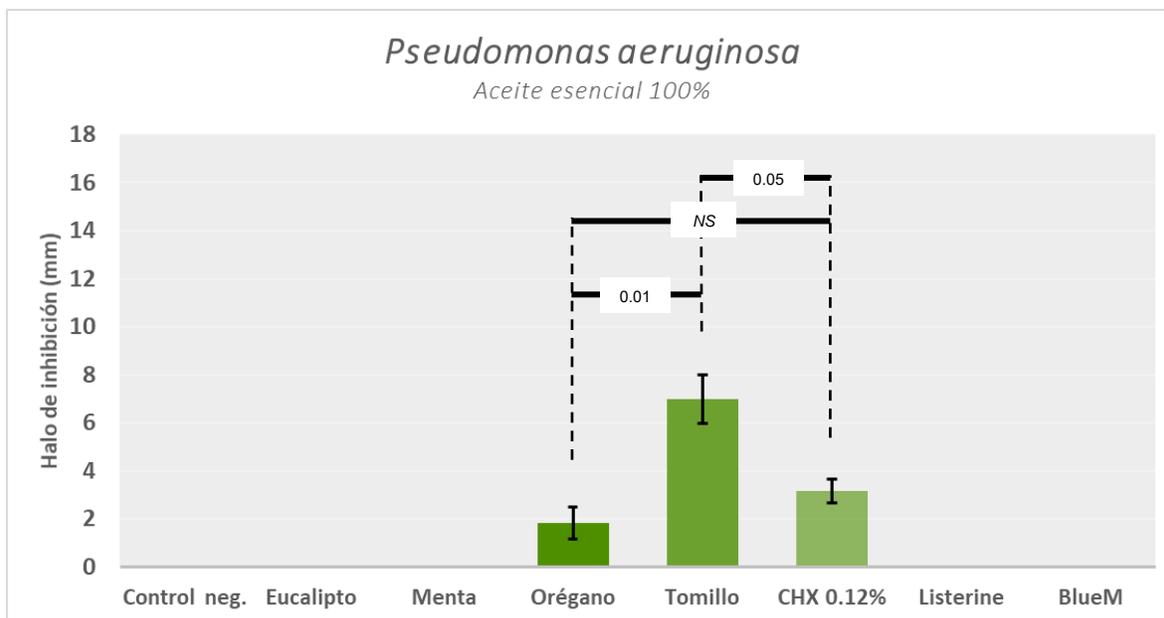


Figura 7. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) evaluados en la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

La **figura 8** muestra los resultados obtenidos de la evaluación antimicrobiana de los diferentes AEs probados en el presente trabajo, diluidos al 50%, sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *P. aeruginosa*. Se puede observar que los AE de eucalipto y menta no tuvieron efecto inhibitorio sobre esta cepa.

También se observa que el control positivo de CHX al 0.12% tuvo el mayor halo de inhibición ($1.4 \pm 0.3\text{mm}$), sin embargo, dicha inhibición no fue estadísticamente significativa con respecto al halo de inhibición observado con el AE de tomillo ($0.7 \pm 0.6\text{mm}$) (NS).

Por otro lado, el AE de orégano ($0.3 \pm 0.6\text{mm}$) mostró el menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la cepa *P. aeruginosa*, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el efecto antibacteriano logrado por el AE de orégano y el AE de tomillo, o el grupo de CHX al 0.12% (NS).

Finalmente, los enjuagues Listerine[®] y Blue[®]M no mostraron un efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*.

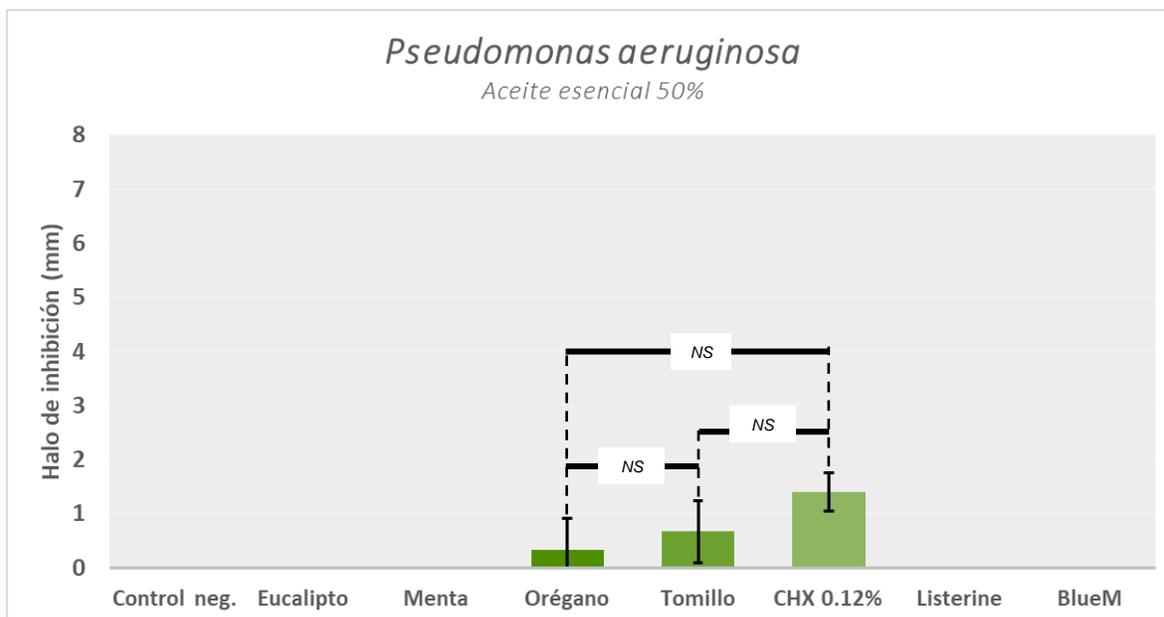


Figura 8. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) diluidos al 50% sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*.

9.4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto, menta, orégano y tomillo sobre la especie bacteriana *Staphylococcus aureus*.

La **figura 9** muestra los resultados de la evaluación del efecto inhibitorio de los diferentes AEs sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*. Se encontró que el AE que mayor halo de inhibición tuvo fue tomillo ($14.8 \pm 1.4\text{mm}$), siendo esta inhibición estadísticamente significativa con respecto a la inhibición encontrada con los aceites esenciales de eucalipto ($p < 0.001$), menta ($p < 0.001$) y orégano ($p < 0.01$), observándose que el AE de eucalipto mostró un halo de inhibición de $1.7 \pm 0.8\text{mm}$, el AE de menta un halo de $1.3 \pm 0.3\text{mm}$ y el AE de orégano un halo de $9.3 \pm 1.0\text{mm}$. El AE de tomillo incluso tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor al observado con el grupo CHX al 0.12% ($p < 0.001$).

El efecto antibacteriano mostrado por la CHX al 0.12% ($3 \pm 0.4\text{mm}$) fue significativamente mayor al observado con el enjuague Blue[®]M ($0.7 \pm 0.1\text{mm}$) ($p < 0.05$). Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativa en el efecto antibacteriano producido por los AEs de eucalipto y menta (NS).

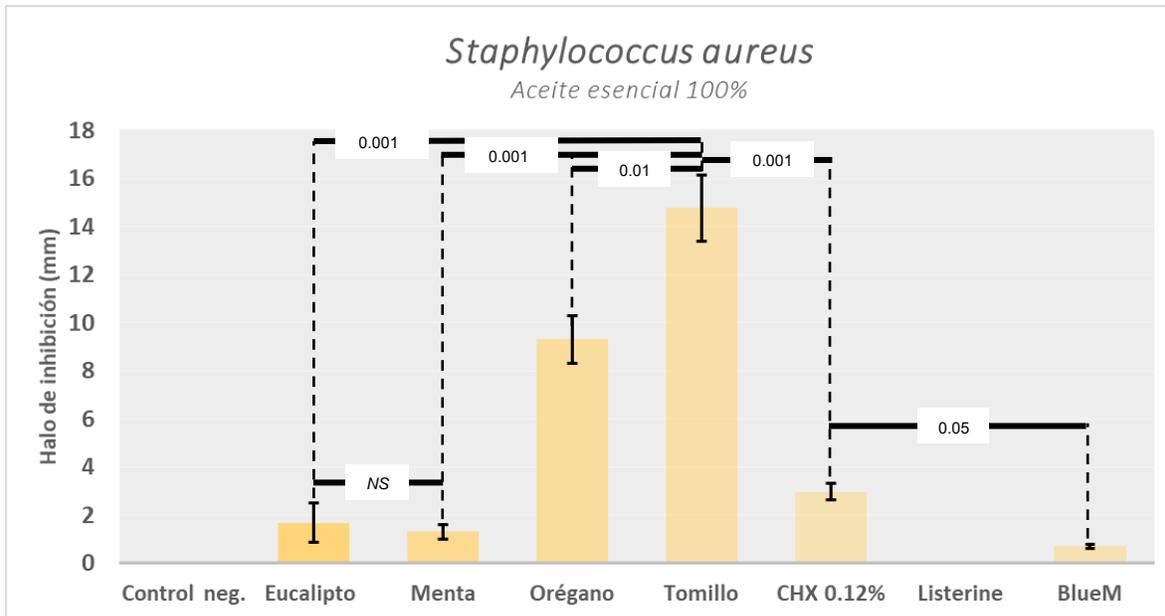


Figura 9. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) evaluados en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Finalmente, la **figura 10** muestra los resultados de la evaluación del efecto inhibitorio de los AEs de eucalipto, menta, orégano y tomillo diluidos al 50% sobre el crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus*. Se encontró que el AE de eucalipto logró un halo de inhibición de $0.3 \pm 0.6\text{mm}$, mientras que el aceite esencial de menta produjo un halo de inhibición de $0.7 \pm 0.6\text{mm}$, siendo esta diferencia no estadísticamente significativa (*NS*). Por otro lado, se observó que el AE de orégano logró el mayor halo de inhibición ($5.6 \pm 0.9\text{mm}$), siendo esta inhibición estadísticamente significativa con respecto a la inhibición encontrada con los AE de eucalipto ($p < 0.001$), menta ($p < 0.001$), tomillo ($p < 0.05$) y con respecto al control positivo de CHX al 0.12% ($p < 0.05$).

El efecto antibacteriano de CHX al 0.12% ($3.2 \pm 0.8\text{mm}$) fue significativamente mayor que el efecto inhibitorio logrado por el enjuague Blue[®]M ($1 \pm 0.0\text{mm}$), $p < 0.05$.

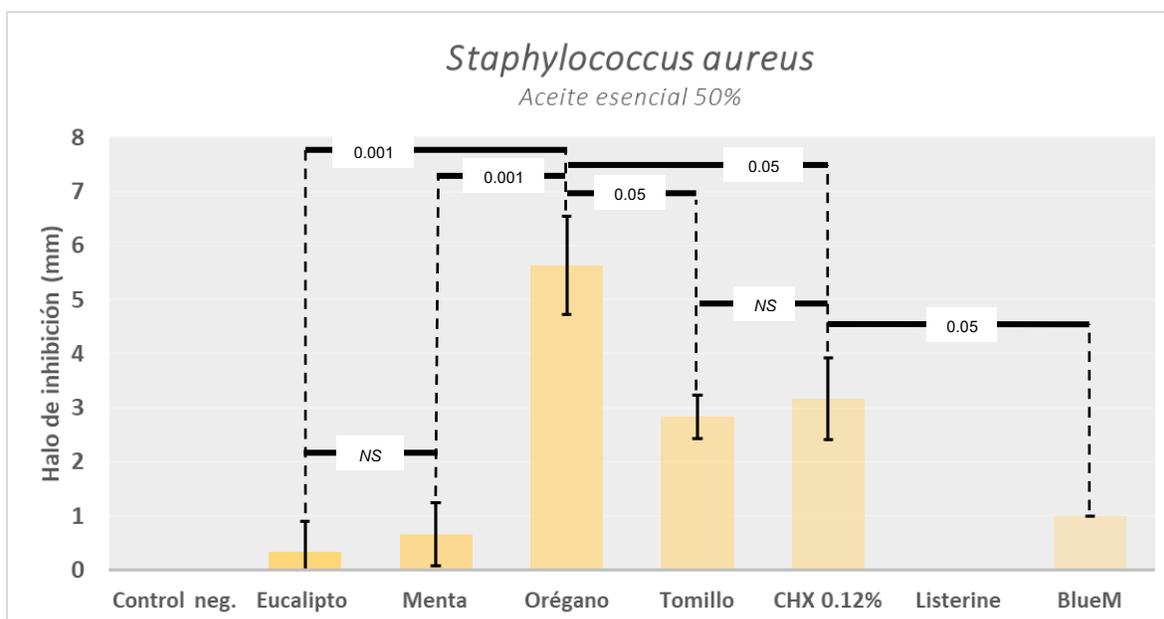


Figura 10. Comparación del efecto inhibitorio de los diferentes aceites esenciales (eucalipto, menta, orégano y tomillo) diluidos al 50% sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*.

Las **tablas 5 y 6** nos muestran el resultado (mm) de la medición de los halos de inhibición bacteriana de los AEs en las cepas bacterianas evaluadas en el presente trabajo.

Tabla 5. Resultado de la medición de los halos de la inhibición bacteriana de los AEs al 100% en las diferentes cepas bacterianas evaluadas.

	Eucalipto	Menta	Orégano	Tomillo	CHX	Listerine®	Blue®M
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1.2±0.3mm	1.9±0.2mm	15.1±1.0mm	7.4±0.0mm	1.7±0.2mm	-	-
<i>P. gingivalis</i>	1.0±0.0mm	1.1±0.2mm	14.3±0.6mm	5.8±0.4mm	2.3±0.6mm	-	0.7±0.6mm
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	1.8±0.7mm	7.0±1.0mm	3.2±0.5mm	-	-
<i>S. aureus</i>	1.7±0.8mm	1.3±0.3mm	9.3±1.0mm	14.8±1.4mm	3.0±0.4mm	-	0.7±0.1mm

Tabla 6. Resultado de la medición de los halos de la inhibición bacteriana de los AE al 50% en las diferentes cepas bacterianas evaluadas.

	Eucalipto	Menta	Orégano	Tomillo	CHX	Listerine®	Blue®M
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	6.3±0.9mm	3.4±0.2mm	1.0±0.0mm	-	-
<i>P. gingivalis</i>	-	-	4.6±0.7mm	2.4±0.9mm	3.0±0.0mm	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	0.3±0.6mm	0.7±0.6mm	1.4±0.3mm	-	-
<i>S. aureus</i>	0.3±0.6mm	0.7±0.6mm	5.6±0.9mm	2.8±0.4mm	3.2±0.8mm	-	1.0±0.0mm

10. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de cuatro diferentes aceites esenciales: eucalipto, menta, orégano y tomillo, sobre el crecimiento de bacterias asociadas con infecciones en tejidos periodontales, dos de ellas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivales*, asociadas con la enfermedad periodontal¹⁴⁶, mientras que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* han sido previamente asociadas con infecciones peri-implantares³¹.

Cuando se evaluó el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus radiata*) al 100% sobre las 4 cepas periodontopatógenas, este mostró un efecto antibacteriano sobre la bacteria Gram positiva *S. aureus*, con un halo de inhibición de 1.7 mm, lo que coincide con Argote E. *et al.*, quienes evaluaron AE de eucalipto (1,8 cineol y pineno como compuestos principales), limón y mandarina frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*¹⁰³. Los autores mostraron que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a diferentes tipos de aceites esenciales que las bacterias Gram negativas, basándose en el resultado obtenido con la bacteria *S. aureus* que mostró inhibición por el AE de eucalipto a diferencia de *E. coli*, que fue más resistente. Otros autores como Ait-Ouazzou *et al.*¹⁴⁷, Montero-Recalde *et al.*,¹⁴⁸ también manifiestan que el aceite de eucalipto presenta efecto antibacteriano con predilección a bacterias Gram positivas como *S. aureus*.

Yañez y Cuadro¹⁴⁹, evaluaron el efecto antibacteriano de los aceites de las especies *E. globulus* y *E. camaldulensis*, obteniendo como resultado que el AE de *E. globulus* que contenía como compuesto principal 1,8-Cineol (77-82%) en una concentración del 80%, tuvo un halo de inhibición de 4 mm sobre *S. aureus*, además demostró poseer mayor eficiencia en cuanto a la actividad antibacteriana frente a otras bacterias Gram positivas y Gram negativas. Es por esto que también se confirma el resultado obtenido en el presente trabajo sobre las bacterias Gram negativas: *A. actinomycetemcomitans* con un halo de inhibición de 1.7 mm y *P. gingivalis* con un halo de inhibición de 1 mm, esto respaldado también por autores como Vieira *et al.*,¹⁵⁰ que demostraron que el efecto antimicrobiano es menor para cepas Gram negativas como *E. coli*.

En el caso de la bacteria *P. aeruginosa*, el AE de eucalipto no mostró ninguna actividad antibacteriana sobre dicha cepa, al igual que en el estudio de Ait-Ouazzou *et al.*, quienes observaron que el AE de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) con 1,8-cineol como compuesto principal (79.85%), no mostró actividad inhibitoria sobre *P. aeruginosa*¹⁴⁷. Por otro lado, Alzamora *et al.*, evaluaron la actividad *in vitro* del AE *Eucalyptus globulus*

(eucalipto) sobre diez microorganismos, entre ellos *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Discos de papel fueron impregnados de AE puro (5 µL), los resultados mostraron que el AE de eucalipto tiene un efecto antibacteriano bajo contra *S. aureus* y nulo contra *P. aeruginosa*, que no mostró sensibilidad ante dicho AE ¹⁵¹.

Por otro lado, se ha reportado que el aceite esencial de *Mentha piperita* exhibe una fuerte actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias patógenas humanas Gram positivas, Gram negativas y cepas de hongos ¹⁰⁶. En el presente estudio, al evaluar el AE de menta (*M. piperita*) se observó que logró tener una efectividad antibacteriana sobre las cepas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. aureus*, excepto contra *P. aeruginosa*. En las cepas *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* se observó un halo de inhibición de 1.9 mm y 1.1 respectivamente, mostrando el AE de menta presenta actividad antibacteriana sobre estas cepas, sin embargo, no existe evidencia científica suficiente que respalde estos resultados sobre estas dos bacterias. Por otro lado, otros autores han investigados la actividad antibacteriana de las diferentes presentaciones de extractos de menta (*Mentha piperita*) es decir, acuosas, infusión, decocción, jugo y aceite esencial frente a 100 aislamientos pertenecientes a 11 diferentes especies de bacilos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, y *Enterobacter aerogenes*. La prueba se realizó por el método estándar de difusión en disco. El aceite esencial de menta muestra mayor actividad antimicrobiana con 11.78 mm media zona de inhibición. El jugo de menta también posee actividad antibacteriana con 10,41 mm de halo de inhibición, mientras que todos los aislados eran totalmente resistentes a la infusión acuosa y cocimiento de menta ¹⁵².

Kizil *et al.*, evaluaron la actividad antimicrobiana de los AE de *M. piperita* y *M. spicata*, teniendo como componente principal mentol (35.64%) y carvona (50.33%) respectivamente. Al utilizar el AE de *M. piperita* con 5 µL, este presentó un halo de inhibición de 11.6 mm contra *S. aureus*, sin embargo, no tuvo ningún efecto contra *P. aeruginosa* ¹⁰⁶. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, donde se demostró que el AE de menta tiene efecto antibacteriano sobre *S. aureus*, que mostró un halo de inhibición de 1.3 mm y que el AE no tuvo efecto inhibitorio sobre la cepa *P. Aeruginosa*.

En otro estudio se probaron los AE de *Lavandula angustifolia* y *Mentha piperita*. Los principales componentes de *M. piperita* fueron linalol (22,35%), acetato de linalilo (21,80%), transocimeno (6,16%) y 4-terpineol (5,19%) para *L. angustifolia* y mentol (33,28%), mentona

(22,03%), y acetato de mentilo (6,40%). La actividad antibacteriana *in vitro* de ambos aceites empleados fue alta contra *S. aureus* ¹⁵³.

Al probar la actividad antibacteriana del AE de orégano (*Origanum vulgare*), se pudo observar que este aceite presentó resultados favorables significativos frente a las cuatro cepas probadas en el presente estudio. El orégano dentro de sus compuestos químicos contiene timol y carvacrol, que pertenecen al grupo funcional de los fenoles, estos principios activos atribuyen su efectividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas ¹²⁴.

Se pudo observar que el AE de orégano (*Origanum vulgare*) logro el mayor efecto inhibitorio en la bacteria *A. actinomycetemcomitans*, mostrando un halo de inhibición de 15.1 mm, este resultado coincide con los datos previamente reportados por Yevori L., quien evaluó el efecto inhibitorio del AE de orégano (al 100%) frente a esta cepa, resultando un halo de inhibición de 13.7mm, siendo similar al resultado observado en la presente investigación ¹²⁷. Por otro lado, este mismo estudio realizado por Yevori L., donde también compara el AE de orégano con la CHX al 0.12%, la cual tuvo un halo de inhibición de 13.8 mm, determinando que el efecto inhibitorio de estas dos variables no tiene diferencia estadísticamente significativa entre sí, mientras que, en el presente estudio, el resultado fue diferente ya que la CHX al 0.12% tuvo un halo de inhibición de 1.7, siendo la diferencia estadísticamente significativa con el AE de orégano. Otro estudio realizado por Yonfá, se analizó si existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto oleoso del *Origanum vulgare* en concentración de 50% y 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans*, concluyendo que el AE de *Origanum vulgare* al 100% tuvo mayor efecto sobre *S. mutans*, que a la concentración del 50% ¹⁵⁴. Sin embargo, el aceite esencial de *Origanum vulgare* en sus dos concentraciones (50% y 100%) tiene mayor efectividad antibacteriana que la clorhexidina al 0.12%, coincidiendo con esta investigación, ya que el AE de orégano mostró mayor efecto inhibitorio que la CHX al 0.12% a sus dos concentraciones (50% y 100%) sobre las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. aureus*, con excepción de la cepa *P. aeruginosa*, que en ambas concentraciones (50% y 100%), el AE de orégano tuvo un halo de inhibición menor al de CHX al 0.12%.

Por otro lado, al evaluar el efecto antibacteriano del AE de orégano sobre la cepa *P. gingivalis*, se observó que este AE presentó el mayor halo de inhibición sobre esta bacteria, siendo de 14.7 mm. Pimentel *et al.*, realizaron un estudio *in vitro* evaluando la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *O. vulgare* al 100%, comparado con clorhexidina al

0.12% frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Porphyromonas gingivalis*¹²⁶. El extracto frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Porphyromonas gingivalis*, demostró alto efecto inhibitorio comparado con las sustancias utilizadas como tratamientos convencionales, además, se observó que a medida que la concentración del extracto etanólico de *O. vulgare* disminuye, la medición de los halos de inhibición también disminuye frente a *Porphyromonas gingivalis*.

Autores como Bastos M *et al.*, evaluaron la concentración mínima bactericida del AE de *O. vulgare* frente a bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*¹²³. El aceite esencial de *O. vulgare* no presentó efecto para *P. aeruginosa*, pero se comprobó la actividad *in vitro* de este AE frente a las bacterias que pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Este estudio coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que en la cepa bacteriana *S. aureus* se observó un halo de inhibición de 9.3 mm, confirmando una actividad antibacteriana. Esta medición del halo de inhibición coincide con los resultados mostrados por Cargua, donde se obtuvo un halo de inhibición de 9.60 mm 48 horas después¹⁵⁵.

Los resultados del presente estudio también coinciden con una investigación realizada por Vásquez *et al.*, donde se evaluó el efecto del AE de orégano frente a *Staphylococcus aureus* obteniendo un halo de inhibición 32 mm¹⁵⁶. A pesar de que en el presente estudio se obtuvo un halo de inhibición de 9.3 mm, se puede explicar esta diferencia debido a que puede existir una variabilidad de concentraciones de los diversos compuestos de los aceites esenciales que puede cambiar por múltiples factores, por ejemplo: el clima, el tiempo y lugar de recolección o por el método de extracción utilizado, entre otros.

En el caso de la bacteria *P. aeruginosa*, esta cepa presentó mayor resistencia a los AEs evaluados en el presente trabajo. Autores como Albado E *et al.*, determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *O. vulgare* sobre las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, las cuales mostraron diferentes grados de sensibilidad y concluyeron que el AE de *O. vulgare* posee actividad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *Pseudomonas aeruginosa*¹²⁴. Otros autores coinciden con lo anterior, Albado *et al.*, determinaron la actividad antimicrobiana del AE de *Origanum vulgare*, el cual se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua. La

actividad antimicrobiana del AE se realizó por el método de difusión en agar. El resultado de la investigación confirma que el AE de orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas., sin embargo, la bacteria *P. aeruginosa* no mostró sensibilidad frente al AE ¹²⁴. Existen múltiples estudios en los que también se ha encontrado que los AE de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra diferentes bacterias, sin embargo, se reporta que no hay efecto contra *P. aeruginosa* ¹⁵⁷. A pesar de los estudios encontrados, los resultados mostrados en la presente investigación mostraron un efecto inhibitorio del AE de orégano sobre la bacteria *P. aeruginosa*, con un halo de inhibición de 1.8 mm con una concentración del AE del 100% y un halo de inhibición de 0.3 mm con una concentración del 50%.

Los resultados de los experimentos con el AE de orégano confirman el potencial de esta planta y su actividad antimicrobiana, por lo que se considera importante analizar y explorar más acerca de sus beneficios para poder entender más a fondo los mecanismos de acción responsables detrás de propiedades antimicrobianas observadas en este AE.

Al analizar la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*), se observó que este AE tuvo los mayores efectos inhibitorios sobre las 4 bacterias probadas en el presente estudio. El AE de tomillo tuvo el mayor halo de inhibición sobre la bacteria Gram positiva *S. aureus*, siendo este de 14.8 mm, coincidiendo con un estudio donde se evaluaron diferentes AE aceites esenciales sobre cinco bacterias patógenas, entre ellas *S. aureus*, cuando se observó el halo de inhibición que provocó el AE de tomillo, se observó que fue de 8.5 mm, los resultados mostraron que las bacterias Gram positivas fueron más sensibles a la inhibición del AE de tomillo que las bacterias Gram negativas ¹³⁴. Rota C *et al.*, también analizaron diferentes AEs para evaluar su efectividad en el control del crecimiento y supervivencia de microorganismos patógenos, donde los AE de *Satureja montana* y *Thymus vulgaris* mostraron el efecto inhibitor más potente contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Shigella flexneri* ¹⁵⁸.

Además, el AE de tomillo tuvo efecto inhibitorio sobre las bacterias Gram negativas analizadas en el presente estudio, donde mostró un halo de inhibición de 7.4 mm sobre *A. actinomycetemcomitans*, un halo de 7 mm sobre *P. aeruginosa*, siendo ambos resultados estadísticamente significativos comparados con los resultados obtenidos en ambas cepas con el AE de orégano, sin embargo, ambos aceites esenciales tuvieron un gran efecto

inhibitorio sobre estas dos cepa, por lo que se cree que es debido a la similitud de sus compuestos químicos, ya que se ha reportado que tanto el AE de orégano como el AE de tomillo poseen diferentes concentraciones de monoterpenos fenólicos como carvacrol y timol que son antibacterianos para diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas ¹²⁸. Fani M y cols., mostraron en un estudio la gran actividad antimicrobiana *in vitro* del AE *Thymus vulgaris* en algunos aislados de patógenos orales, incluido *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, confirmando su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, además, los autores sugieren que el AE de tomillo podría usarse en enjuagues bucales, pasta de dientes o aromaterapia para la prevención y tratamiento de infecciones orales relacionadas ¹³⁴, sin embargo, es importante realizar más estudios que demuestren la efectividad de estos AE tanto *in vitro* como *in vivo*, y así obtener mayor evidencia científica que respalde su efecto y su uso seguro como productos de cuidado oral. En el caso de la bacteria *P. aeruginosa*, el AE de tomillo mostró un halo de inhibición de 7 mm, coincidiendo con estudios que validan el efecto antibacteriano *in vitro* de este AE además de su actividad antifúngica en algunos patógenos ^{134,135}.

En el presente estudio, hubo actividad antimicrobiana de los AE sobre las 4 bacterias evaluadas, tanto las Gram positivas (*S. aureus*), como las Gram negativas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. aeruginosa*). Las bacterias están rodeadas por una envoltura celular conformada por la pared celular bacteriana y la membrana celular, en el caso de las bacterias Gram negativas, estas poseen una membrana externa que actúa como protección frente a muchos agentes antibacterianos, algunos autores afirman que podría existir una mayor resistencia en las bacterias Gram negativas que en bacterias Gram positivas debido a su pared celular ^{83,94}.

Es difícil atribuir la actividad antibacteriana sólo a un compuesto particular dentro de la mezcla compleja de constituyentes presentes en los AEs, de esta forma, una mayor concentración del componente principal no significa necesariamente que se obtendrán los mejores efectos antimicrobianos para las cepas evaluadas, también es importante tener en cuenta los posibles efectos sinérgicos y / o antagonistas de los diferentes componentes dentro de los diferentes AEs.

11. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pudo comprobar el efecto antibacteriano de los diferentes aceites esenciales evaluados. Se encontró que el AE de orégano (*Origanum vulgare*) al 100% mostró el mayor efecto antimicrobiano contra las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, seguido de la cepa bacteriana *S. aureus*, mientras que la bacteria *P. aeruginosa* tuvo la menor sensibilidad a este aceite. Mientras que las bacterias *A. actinomycetemcomitans* y *S. aureus* mostraron mayor sensibilidad al AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) a concentraciones del 100%. Seguido de las bacterias *P. aeruginosa* y *P. gingivalis*.

Los AEs de menta (*Mentha piperita*) y eucalipto (*Eucalyptus radiata*) al 100% mostraron el menor efecto antibacteriano contra las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. aureus*, mientras que no mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. aeruginosa*.

También se pudo observar que al ser diluidos 50% todos los AEs probados disminuyeron su efecto inhibitorio o incluso perdieron su actividad antibacteriana observada con sus homólogos sin diluir (100%), como fue el caso de los AEs de menta y eucalipto, que perdieron su efecto inhibitorio sobre las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

Los resultados positivos observados en el presente trabajo nos indican que la utilización de los aceites esenciales *Mentha piperita*, *Eucalyptus radiata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* pueden ser una alternativa terapéutica eficaz al uso de antisépticos orales actualmente disponibles en el mercado, sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios adicionales que valuen posibles efectos adversos antes de poder considerar su uso en aplicaciones clínicas para el control de enfermedades periodontales como periodontitis o peri-implantitis.

12. PERSPECTIVAS

Después de determinar la efectividad antimicrobiana de los aceites esenciales de los aceites esenciales menta (*Mentha piperita*), eucalipto (*Eucalyptus radiata*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) que fue el principal objetivo del presente trabajo, es necesario tomar en cuenta diferentes aspectos antes de poder considerar la aplicación clínica de estos aceites:

- **Citotoxicidad**, se considera importante llevar a cabo estudios adicionales que nos permitan determinar las concentraciones de seguridad que permitan la viabilidad de células eucariotas.
- **Concentraciones mínimas inhibitorias**, para cada uno de los aceites esenciales evaluados en el presente trabajo.
- **Composición química**, se considera relevante llevar a cabo la caracterización de cada uno de los aceites esenciales, para poder tener una mayor comprensión del efecto antibacteriano observado en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Lang NP, Suvan JE, Tonetti MS. Risk factor assessment tools for the prevention of periodontitis progression a systematic review. *Journal of clinical periodontology* 2015;42: S59-S70.
- ² Chimenos-Küstner E, et al. Disbiosis como factor determinante de enfermedad oral y sistémica: importancia del microbioma. *Med Clin (Barc)*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.05.036>
- ³ Escribano M, Matesanz P BA. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2005;17(2):79–87.
- ⁴ Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1: S173-S182.
- ⁵ Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?" *J Dent Res*. 2015;94(12):1628-37. doi: 10.1177/0022034515606045.
- ⁶ Dean, J. A., Hughes, C. V. *Mechanical and Chemotherapeutic Home Oral Hygiene*. McDonald and Avery Dentistry for the Child and Adolescent, (2011). 205–222. doi:10.1016/b978-0-323-05724-0.50015-1
- ⁷ Gunsolley, J. C. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Journal of Dentistry*, 2010. 38, S6–S10. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(10\)70004-X](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(10)70004-X)
- ⁸ Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000,1997;15:55-62.
- ⁹ Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 6.ª ed. Wiley Blackwell; 2015, p. 718-738.
- ¹⁰ Vernon LF. From Surgical Suite to Fresh Breath-The History of Listerine®. *Int J Dent Oral Health* 2018 4(3). DOI: 10.16966/2378-7090.263
- ¹¹ Fine D, Letizia I., Mandel I. The effect of rinsing with Listerine antiseptic on the properties of developing dental plaque. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 660-666.
- ¹² Platt C., Tosta E., Machado M. Uso de los diferentes agentes químicos para el control de la placa bacteriana como coadyuvantes en la prevención de las enfermedades gingivales. *ODUS científica*. 2004. Vol. V. No. 1
- ¹³ Bermúdez L, González ME. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica [Internet]*. 2016 [citado 23 marzo 2020]; Vol.20. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300002
- ¹⁴ Almaguer A, Villagómez G. 1.ª ed. México: Manual Moderno; 2017.
- ¹⁵ Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1999. 1318-1322
- ¹⁶ Poyato M, Segura J. La placa bacteriana: Conceptos básicos para el higienista bucodental. *Periodoncia [Internet]*. 2001 [citado 23 marzo 2020];11(2). Disponible en: http://www.sepa.es/images/stories/SEPA/REVISTA_PO/articulos.pdf/11-2_05.pdf
- ¹⁷ Nazar C Julio. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello [Internet]*. 2007 Abr [citado 2021 Ene 24] ; 67(1) : 161-172. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>.
- ¹⁸ Patel, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*, (2005); 41-47
- ¹⁹ Ortega S., Hernández E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2018;75
- ²⁰ Caton J., Armitage G., Berglundh T. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20): S1–S8.
- ²¹ Sanz I. Control superior de los biofilms orales. *Gaceta dental [Internet]*. 2017 [citado 22 abril 2020];(292). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/318378448>
- ²² Chimenos-Küstner E, et al. Disbiosis como factor determinante de enfermedad oral y sistémica: importancia del microbioma. *Med Clin (Barc)*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.05.036>
- ²³ Ryan K, Ray G. Sherris. *Microbiología médica*. 6.ª ed. McGrawHill; 2017.
- ²⁴ Sarduy L., González M. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica [Internet]*. 2016 Sep [citado 2021 Ene 23] ; 20(3) : 167-175. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300002&lng=es.
- ²⁵ OMS. Salud Bucodental. Centro de prensa. Nota informativa 25 marzo 2020 [acceso Junio del 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
- ²⁶ Chapple I., Mealey B., Van Dyke T. et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20): S68–S77.
- ²⁷ Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment [Internet]*. 2013 [citado febrero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0027>

- ²⁸ Morales A., Bravo J., Baeza M., Werlinger F., Gamonal J. Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* [Internet]. 2016 Ago [citado 2021 Ene 24]; 9(2): 203-207. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.004>.
- ²⁹ Tonetti M., Greenwell H., Kornman K. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20): S149–S161.
- ³⁰ Moreno S, Parra B, Botero JE. Microbiota subgingival y de tejido valvular. *Biomédica* [Internet]. 2017 [citado 19 abril 2020];37. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37n4/0120-4157-bio-37-04-00516.pdf>
- ³¹ Hurtado A, Bojórquez Y, Montaña M, López JA. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *ORAL* [Internet]. 2016 [citado 19 abril 2020];17(54). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
- ³² Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134-44
- ³³ Peña M., Calzado da Silva M., González M., Cordero S., Azahares H. Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. *MEDISAN* [Internet]. 2012 Jul [citado 2020 Jun 04] ; 16(7): 1137-1148. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000700014&lng=es.
- ³⁴ Berglundh T., Armitage G., Araujo M. y cols. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20): S286–S291.
- ³⁵ Albertini M., López-Cerero L., O'Sullivan M., et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin. Oral Impl. Res.* 0, 2014 / 1–5
- ³⁶ Pérez D., Pérez J. Características microbiológicas de la periimplantitis y la periodontitis. *MEDISAN* [Internet]. 2020 oct [citado 2021 Ene 24]; 24(5): 982-1003. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192020000500982&lng=es. Epub 14-Oct-2020.
- ³⁷ Tabanella G., Nowzari H., Slots J. Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 11 (1) (2009), pp. 24-36
- ³⁸ L.J. Heitz-Mayfield, N.P. Lang. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology* 2000, 53 (June) (2010), pp. 167-
- ³⁹ Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Oct; 10(5):339-45.
- ⁴⁰ Kronström M, Svenson B, Hellman M, Persson GR. Early implant failures in patients treated with Brånemark System titanium dental implants: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 Mar-Apr; 16(2):201-7. doi: 10.1371/journal.pone.0056771
- ⁴¹ Romeo E, Ghisolfi M, Carmagnola D. Peri-implant diseases. A systematic review of the literature. *Minerva Stomatol* 2004; 53:215–230. DOI: 10.1002/jbm.b.31152.
- ⁴² Peleg AY., Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Caused by Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med* 2010 May 13.
- ⁴³ Pérez D., Pérez J. Características microbiológicas de la periimplantitis y la periodontitis. *MEDISAN* [Internet]. 2020 oct [citado 2021 Ene 24]; 24(5): 982-1003. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192020000500982&lng=es. Epub 14-Oct-2020.
- ⁴⁴ Solano P., Ortiz-Vigón A., Bascones A. Concepto actual de la patogénesis de la periimplantitis y el papel que ocupan las bacterias. *Avances en Periodoncia* [Internet]. 2017 Abr [citado 2021 Ene 25] ; 29(1): 31-42. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852017000100004&lng=es.
- ⁴⁵ Flores R. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2011 Dic [citado 2020 Jun 04] ; 28(6): 579-580. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000700011&lng=es.
- ⁴⁶ Ramos D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* patógeno importante en la periodontitis agresiva. *Revista Kiru.* 2011;8(2).
- ⁴⁷ Gholizadeha P., Pormohammadc A., et al. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial Pathogenesis* 113 (2017) 303–311
- ⁴⁸ Brígido JA, da Silveira VRS, Rego RO, Nogueira NAP. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals—a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014 Internet. (Citados 04 junio 2020) Disponible en: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v19i2/medoralv19i2p184.pdf>
- ⁴⁹ Slots J, Rosling BG. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1983: 101: 465-486.
- ⁵⁰ Bascones A, Caballeros A. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas Gingivales* como principales patógenos periodontales. *Avances en Periodoncia* [Internet]. 2000 Sep [citado 2020 Mayo 27] ; 12(2): 69-75. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-6585200000200002&lng=es.

- ⁵¹ Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J. Bergeys Manual de Bacteriología Determinativa. Prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* y estado de salud periodontal. Novena edición. Estados Unidos: J Clin Microbiol; 1998 Nov; 36 (11): 3239–3242.
- ⁵² Río M. Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio in vitro. [Tesis]. Chile: Universidad de Chile. Área de microbiología; 2006.
- ⁵³ Bernal Ortega C. Estudio de transmisión de periodontopatógenos entre parejas pre y postratamiento periodontal. [Licenciada en Odontología]. Universidad de Sevilla; 2015.
- ⁵⁴ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. DATABiO. *Pseudomonas aeruginosa*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. (Internet) 2016. DB-B-P.a-16. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonas+aeruginosa+2017.pdf/7e1ed73b-eca5-4578-a4f7-1c8847e6a799>
- ⁵⁵ Souto R, Silva-Boghossian C, Vieira Colombo AP. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. 2014 [citado 1 abril 2020];45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166274/pdf/bjm-45-495.pdf>
- ⁵⁶ Paz-Zarza V., Mangwani-Mordani S., Martínez-Maldonado A., Álvarez-Hernández D., Solano-Gálvez S., Vázquez-López R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2019 Abr [citado 2020 Jun 10] ; 36(2): 180-189. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>.
- ⁵⁷ Lewis K. Antibióticos: recupera el arte perdido del descubrimiento de fármacos. *Naturaleza*. 2012; 485 (7399): 439-440.
- ⁵⁸ Peleg AY, Hooper DC. Infecciones intrahospitalarias por bacterias gram-negativas *N Engl J Med*. 2010; 362 (19): 1804-1813.
- ⁵⁹ González González María Isabel, García Melián Maricel, Mariné Alonso María de los Ángeles. Importancia sanitaria de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de hemodiálisis y su desinfección. *Rev Cubana Salud Pública* [Internet]. 2014 Jun [citado 2021 Feb 09] ; 40(2): 198-211. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662014000200005&lng=es.
- ⁶⁰ Luján D., *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* [Internet]. 2014;48(4):465-474. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53535594009>
- ⁶¹ Colombo A, Barbosa G, Higashi D. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2013 [citado 2 febrero 2020];62(10). Disponible en: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.055830-0>
- ⁶² Cervantes García E, García González R, Salazar Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2014 [citado 1 abril 2020];61(1):28–40. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- ⁶³ Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. *Marge Medica Books*. 1° edición. 2019
- ⁶⁴ Kim G-Y, Heon Lee C. Antimicrobial susceptibility and eISSN 2093-2286 pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *Journal of periodontal & implant science* [Internet]. 2015 [citado 2 abril 2020];46(5). Disponible en: <https://jpis.org/DOIx.php?id=10.5051/jpis.2015.45.6.223>
- ⁶⁵ Zendejas Manzo GS, Avalos Flores H, Soto Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación . *Rev Biomed* [Internet]. 2014 [citado 25 abril 2020];25(3). Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>
- ⁶⁶ Zinsli Fritschi B., Albert-Kiszely A. and Persson G. *Staphylococcus aureus* and Other Bacteria in Untreated Periodontitis. *Journal of Dental Research* [Internet]. 2008 [citado 1 abril 2020];61(1):28–40. Disponible en: <http://jdr.sagepub.com/content/87/6/589>
- ⁶⁷ Pérez D., Pérez J. Características microbiológicas de la periimplantitis y la periodontitis. *MEDISAN* [Internet]. 2020 oct [citado 2021 Ene 24]; 24(5): 982-1003. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192020000500982&lng=es. Epub 14-Oct-2020.
- ⁶⁸ Persson, G. R., & Renvert, S. Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2013. 16(6), 783–793. doi:10.1111/cid.12052
- ⁶⁹ Claydon, N. C. Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. *Periodontology* 2000, (2008). 48, 10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00273.x>
- ⁷⁰ Serrano, J., Escribano, M., Roldán, S., Martín, C., & Herrera, D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 2015. 42(16). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12331>
- ⁷¹ Bascones Martínez A, Mudarra Morante S, Perea Pérez E. Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol*. 2002;14(3).

- ⁷² Lindhe J. Periodontología Clínica E Implantología Odontológica. Tomo II.5.^a ed. Panamericana; 2009, p.735-740
- ⁷³ Vernon LF. From Surgical Suite to Fresh Breath-The History of Listerine®. *Int J Dent Oral Health* 2018 4(3). DOI: 10.16966/2378-7090.263org/10.16966/2378-7090.263
- ⁷⁴ Lorca-Salañer Amparo, Carrasquer-Burguesa Assumpta. Efecto local de los colutorios con contenido alcohólico: revisión de la literatura. *RCOE [Internet]*. 2005 Ago [citado 2021 Feb 24] ; 10(4): 407-412. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2005000400003&Ing=es.
- ⁷⁵ Cómo ayudar a sus pacientes a seguir las mejores prácticas de cuidado oral. [Internet]. LISTERINE®. 2019 [citado 1 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.listerine.com.co/profesional/area-educativa/sobre-los-paciente>
- ⁷⁶ Fine DH, Letizia I, Mandel ID. The effect of rinsing with Listerine antiseptic on the properties of developing dental plaque. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 660-666.
- ⁷⁷ Russell A D, Day M J. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993; 25: 229-38.
- ⁷⁸ Martínez-Hernández, M., Reda, B. & Hannig, M. Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clin Oral Invest* (2020). 24, 3843–3853. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03250-3>
- ⁷⁹ Van der Weijden, F. A., Van der Sluijs, E., Ciancio, S. G., & Slot, D. E. (2015). Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/ Gingivitis Control? *Dent Clin North Am*, 59(4). <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.06.002>
- ⁸⁰ Página Oficial Productos Blue®M. Disponible en: <https://www.bluemcare.com/>
- ⁸¹ Mattei, B.M., Imanishi, S.A.W., de Oliveira Ramos, G., de Campos, P.S., Weiss, S.G. and Deliberador, T.M. Mouthwash with Active Oxygen (blue®m) Induces Keratinocytes Proliferation. (2020) *Open Journal of Stomatology*, 10,107-114. <https://doi.org/10.4236/ojst.2020.106012>
- ⁸² Lee TH, Huang TK, Lin SY, Chen LK, Chou MY, Huang HH. Corrosion resistance of different nickel-titanium archwires in acidic fluoride-containing artificial saliva. *Angle Orthod*. 2010 May;80(3):547-53.
- ⁸³ Fisher K, Phyllips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Food Science and Technology*. 2008; 19(3): p. 156-164.
- ⁸⁴ Tisserand, R., & Young, R. *Essential oil safety-e-book: A guide for health care professionals*. (2013) Elsevier Health Sciences
- ⁸⁵ Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review [Internet]. *International Journal of Food Microbiology* 94: Elsevier; 2004 [citado 18 febrero 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246235>
- ⁸⁶ Stashenko E. *Aceites esenciales*. 1.^a ed. Santander; 2009.
- ⁸⁷ Martínez A. *Aceites esenciales* [Internet]. Medellín: UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA; 2003 [citado 9 febrero 2020]. Disponible en: http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
- ⁸⁸ Bakkali F, Idaomar M, Averbeck S, Averbeck D. Biological effects of essential oils – A review [Internet]. Elsevier; 2007 [citado 20 febrero 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>
- ⁸⁹ Bajpai VK, Baek K-H, Kang SC. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. Elsevier; 2011.
- ⁹⁰ Hill, D. *Manual de química de aceites esenciales*. dōTERRA. México. dōTERRA
- ⁹¹ López M. *Los aceites esenciales. Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias*. Offarm. 2004. 23 (7).
- ⁹² Bassolé HR, Juliani HN. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17:3989–4006
- ⁹³ Ravichandran, M. et al. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31, 2011, p. 462–471.
- ⁹⁴ Bassanetti, I. et al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control*, 73, 2017, p. 606-612.
- ⁹⁵ Asquino Natalia, García Ma. Victoria, Mayol Magdalena, Andrade Ernesto, Bueno Rossy Luis Alexandro. *Aceites Esenciales: Una opción quimioterapéutica en Periodoncia*. *Odontoestomatología [Internet]*. 2016 Nov [citado 2020 Mayo 16] ; 18(28): 4-10. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-93392016000200002&Ing=es.
- ⁹⁶ Ambrosio, C.M.S. et al. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 2017, p. 128-136.
- ⁹⁷ *Eucalyptus radiata* Sieber ex DC., 1828 [Internet]. *Inventaire National du Patrimoine Naturel*. 2020 [citado 17 junio 2020]. Disponible en: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/621620/tab/taxo?lg=en

- ⁹⁸ Goldbeck, J.C., Nascimento, J.E., Jacob, R.G., Fiorentini, Â.M., Silva, W.P., 2014. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Ind. Crops Prod.* 60, 304–309.
- ⁹⁹ Mahumane, G., & van Vuuren, S. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of *Eucalyptus radiata* leaf essential oil, sampled over a year. *Journal of Essential Oil Research*, 28(6). <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1175386>
- ¹⁰⁰ Luis Ángel et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2016 [citado 11 febrero 2020];79. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>
- ¹⁰¹ Mahumane, G. Antimicrobial activity and chemical analysis of *eucalyptus radiata* leaf essential oil (Tesis para obtener maestría en farmacia). University of the Witwatersrand. 2016. (citado 23 Junio 2020) Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/78a6/e7c520c1be1ee0493c25862f61911aae4342.pdf>
- ¹⁰² Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J., Wink, M., 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm. Biol.* 49, 893–899.
- ¹⁰³ Argote Vega F., Suarez Montenegro Z. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [Internet]. 2017 [citado 11 febrero 2020];2. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
- ¹⁰⁴ Montero M., Morochó M., Avilés D., Carrasco A., Erazo R. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Rev. investig. vet. Perú* [Internet]. 2019 [citado 12 Junio 2020] ; 30(2): 932-938. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000200042&lng=es.
- ¹⁰⁵ CABI, 2020. *Mentha piperita* (Peppermint). In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.
- ¹⁰⁶ Kizil S, Hasimi N, Tolan V, Kiliç E, Yüksel U. Mineral Content, Essential Oil Components And Biological Activity Of Two *Mentha* Species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Centro Nacional de Informac Turkish Journal of Field Crops* [Internet]. 2010 [citado 8 abril 2020];15(2). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/235778836>
- ¹⁰⁷ Sarer E, Yağmur Toprak S, Otlu B, Durmaz R. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Mentha spicata* L. subsp. *Spicata*. *Journal of Essential Oil Research* [Internet]. 2014 [citado 25 enero 2020];23. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700435>
- ¹⁰⁸ dōTERRA. Peppermint Oil *Mentha piperita* [Internet]. dōTERRA. 2020 [citado 17 junio 2020]. Disponible en: <https://www.doterra.com/US/es/p/peppermint-oil>
- ¹⁰⁹ Hall Ramírez V, Rocha Palma M, Rodríguez Vega E. PLANTAS MEDICINALES VOLUMEN II. Centro Nacional de Información de Medicamentos. 2002
- ¹¹⁰ Maraví GG. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Mentha piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028 [Tesis]. Lima-Perú: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad de Wiener; 2012. Disponible en: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/GISELLA%20GIOVANNA%20MARAVI%20ING A.pdf>.
- ¹¹¹ Terán, J. Respuesta del cultivo de menta (*Mentha aquatica*) a la aplicación edáfica de tres fertilizaciones órgano-minerales, a tres dosis. Otavalo-Imbabura. 2009. Tesis. Ing. Agr. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- ¹¹² Dorman, H. J. D., M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm, and R. Hiltunen. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 51:4563–4569.
- ¹¹³ Mamani B. Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival [Cirujano dentista]. Lima Perú. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad Nacional de San Marcos; 2013
- ¹¹⁴ CABI, 2020. *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/cpc.
- ¹¹⁵ Oniga I, Puscas C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah N-K. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules* [Internet]. 2018 [citado 4 abril 2020];23. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules23082077>
- ¹¹⁶ dōTERRA. Orégano usos y beneficios [Internet]. dōTERRA. 2020 [citado 2 junio 2020]. Disponible en: https://www.doterra.com/MX/es_MX/blog/spotlight-oregano-essential-oil
- ¹¹⁷ Muñoz Centeno LM. PLANTAS MEDICINALES ESPAÑOLAS: *ORIGANUM VULGARE* L. (LAMIACEAE) (ORÉGANO). *Acta Botanica Malacitana* [Internet]. 2002 [citado 13 junio 2020];27:273-. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=793435>

- ¹¹⁸ Bozin B, Dukic-Mimica N, Simin N, Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1822-1828
- ¹¹⁹ Santander Rios J, Criollo Escobar H, Legarda Burbano L. Evaluación del comportamiento de tres especies aromáticas. *Ciencias agrícolas.* 1992;11:42-44.
- ¹²⁰ Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol* [Internet]. 2017 [citado 1 septiembre 2020];27(3). Disponible en: <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
- ¹²¹ Acevedo D, Navarro M, Monroy L. Composición Química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). *Información tecnológica.* 2013;24(4):43-8.
- ¹²² Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, González de Mejía E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 2004;54(1):100-11.
- ¹²³ Marino M, Bersani C, Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 187-195
- ¹²⁴ Albado E, Saez G, Grabiell S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Lima – Perú ; *Rev Med Hered* 12 (1), 2001
- ¹²⁵ Bastos M, Damé L, Souza L, et al. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche bovino. *Rev Cubana de Plantas Medicinales.* 2011; 16(3): p. 260-266.
- ¹²⁶ Pimentel Ramirez E, Castillo Andamayo D, Del Solar Q, Mautua Torres D, Villegas Vilchez L, Díaz Santisteban C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatológica Herediana.* 2015;25(4):268-77.
- ¹²⁷ Yerovi L, Dona M. Efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) frente a cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Tesis para optar al título de Odontólogo. Universidad Central de Ecuador. Ecuador. 2017
- ¹²⁸ Lagos la Rosa E. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *porphyromonas gingivalis* atcc 33277 causante de gingivitis [químico farmacéutico]. Universidad nacional jorge basadre grohmann - tacna. Facultad de ciencias de la salud ; 2012.
- ¹²⁹ Moreno G., y col. (2010). Aplicaciones Medicinales Del Tomillo. *Univ. Cienc. Soc. Santa Cruz de la Sierra.*
- ¹³⁰ Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud. Vol. 77 Núm. 4 (2016)
- ¹³¹ López Luengo MT. Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM.* 2006;25(1):74-77.
- ¹³² Salehi B, Mishra A, Shukla I, Sharifi-Rad M. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research* [Internet]. 2018 [citado 1 septiembre 2020];1(19). Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>
- ¹³³ Lagos la Rosa E. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *porphyromonas gingivalis* atcc 33277 causante de gingivitis [químico farmacéutico]. Universidad nacional jorge basadre grohmann - tacna. Facultad de ciencias de la salud ; 2012.
- ¹³⁴ Fani M, Kohanteb J. In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* [Internet]. 2017 [citado 1 septiembre 2020];22(4). DOI: 10.1177/2156587217700772
- ¹³⁵ Borugă O O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life* . 2014;7(3).
- ¹³⁶ Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 118-122.
- ¹³⁷ Sagdic O. 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *LWT Food Sci. Technol.* 36: 467-473.
- ¹³⁸ Reyes Jurado F, Palou E, Lopez Malo A. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* Puebla: Universidad de las Américas, Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental; 2012.
- ¹³⁹ Ayala-Zavala F., González-Aguilar G., Del-Toro-Sánchez L. Enhancing Safety and Aroma Appealing of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using the Antimicrobial and Aromatic Power of Essential Oils. *Journal Of Food Science.* Vol. 74, Nr. 7, 2009
- ¹⁴⁰ Perricone M., Arace E., Corbo M., Sinigaglia M. y Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology. Food Microbiology.* 2015. Vol.6. Art. 76
- ¹⁴¹ Mendizine. *Menta piperita* (Menta). Portal hispano de medicina, medicamentos y plantas medicinales. 2010. Disponible en: <http://www.medizine.com/plantas2/menta.php>.
- ¹⁴² Zambrado Ravelo VM. Respuesta productiva de la especie vegetal medicinal aromática menta [Ingeniero agropecuario]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito; 2013.

-
- ¹⁴³ Quispe Valencia D. Uso Terapeutico De Menta Piperita (Menta) En Pobladores Del Asentamiento Humano Las Lomas De La Pradera. Pimentel. [Químico farmacéutico]. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote; 2016.
- ¹⁴⁴ Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028 [Cirujano dentista]. Universidad WIENER; 2012
- ¹⁴⁵ Schovelin A, Muñoz M. Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans*. *Int. J. Odontostomat.* 2018;12(4).
- ¹⁴⁶ Hurtado Camarena A, Bojórquez Anaya Y, Montaña Pérez M de L, López Mendoza JA. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *ORAL* [Internet]. 2016 [citado 19 abril 2020];17(54). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
- ¹⁴⁷ Ait-Ouazzou A1, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, Pagán R, et al. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agr* 91: 26432651. doi: 10.1002/jsfa.4505
- ¹⁴⁸ Montero-Recalde M., Morocho-Núñez M., Avilés-Esquivel D., Carrasco-Cando A., Erazo-Gutierrez R. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Rev. investig. vet. Perú* [Internet]. 2019 Abr [citado 2021 Ene 17]; 30(2): 932-938. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000200042&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16099>
- ¹⁴⁹ Yáñez X, Cuadro O. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* 2012; 10(1): p. 52-61.
- ¹⁵⁰ Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes A, Martins da Costa P, et al. 2017. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chem Biodivers* 14: e1700006. doi: 10.1002/cbdv.201700006
- ¹⁵¹ Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina.* Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2001; 62 (2): 156-161.
- ¹⁵² Sabahat Saeed, Naim Asma, Tariq Perween. Actividad Antibacteriana In Vitro De La Menta. *Pak. J. Bot.* 38 (3): 869-872, 2006. Pakistán
- ¹⁵³ Djenane D, Yangüela J, Idir L, D Gómez. Efectos antioxidantes y antibacterianas de los aceites esenciales de *Lavandula* y *Mentha* en carne picada de vacuno inoculada con *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración. *BP* 17, 15000, TiziOuzou, Argelia. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789458>
- ¹⁵⁴ Yonfá L, Lorena L. Efecto inhibidor del extracto oleoso del Orégano vulgare sobre el crecimiento in vitro de cepas de *Streptococcus mutans*: Quito: UCE; 2017.
- ¹⁵⁵ Cargua Q. Efecto inhibitorio del extracto de *Origanum vulgare* (orégano) en cepas de *Staphylococcus aureus*. Estudio in vitro [Tesis]. Quito Universidad Central del Ecuador; 2019.
- ¹⁵⁶ Vásquez M, Alcarado P, Rodríguez I, Saldaña W, Reyes W, Vargas A. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *Revista Rebiol.* 2014 enero-junio; 34(1): p. 57-68.
- ¹⁵⁷ Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1202-1205.
- ¹⁵⁸ Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. 2004. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Protect.* 67: 1252-1256