

## ► Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) sobre colonias de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

*Inhibitory effect in vitro of the essential oil from the leaves de Minthostachys mollis (summon) on Enterococcus faecalis colonies has more than enough ATCC 29212.*

Wesley Alaba Castañeda \*, César Jiménez Prado \*\*

### RESUMEN

**Objetivos:** Determinar y comparar el efecto inhibitorio in vitro del IKI al 2% y el aceite esencial de *Minthostachis mollis* (muña) frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. **Materiales y métodos:** Se evaluó la susceptibilidad utilizando el método de difusión de discos o Kirby-Bauer. Se utilizaron 7 placas Petri con agar Muller-Hinton donde se sembraron las cepas del *E. faecalis* y se colocaron los discos con el IKI al 2 % o con el aceite esencial de muña al 100% y en dilución etanólica al 50 %. Las placas se incubaron a 37°C en estufa, se evaluó las placas midiendo el halo de inhibición de cada disco a las 24, 48 y 72 horas utilizando una regla milimetrada. **Resultados:** A las 24 horas todos los discos produjeron un halo de inhibición, donde el mayor registrado fue el del aceite esencial al 100%, y el de menor promedio fue el del IKI al 2 % los halos disminuyeron de tamaño en la lectura a las 72 horas. **Conclusiones:** El aceite esencial de *Minthostachis mollis* (muña) al 100% posee mayor actividad inhibitoria in vitro sobre el crecimiento del *E. faecalis* que el IKI al 2% y la dilución etanólica de aceite esencial al 50%.

**Palabras Claves:** *Minthostachys mollis*, *Enterococcus faecalis*, yoduro de potasio.

### ABSTRACT

**Objectives:** Determine and compare the inhibitory effect in vitro from IKI 2% solution and *Minthostachis mollis* (muña) essential oil, against strains of *Enterococcus faecalis*. **Materials and methods:** The susceptibility test was made using the dissemination in discs method or Kirby-Bauer method. Seven plates were used containing culture medium Muller-Hinton, where the

\* Magíster en Estomatología. Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca. Perú. E-mail: wesley.alaba@upagu.edu.pe

\*\* Doctor en Estomatología. Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Nacional de Trujillo. Perú.

*Enterococcus faecalis* strain were sown. The discs with 2 different concentrations of *Minthostachis mollis* essential oil 50% and 100%, and IKI 2% solution were placed in the plates. These were incubated at 37°C measured halos with a rule after 24, 48 and 72 hours. **Results:** 24 hours later, all discs presented inhibition halos; the biggest was produced by *Minthostachis mollis* essential oil 100% pure. And the smallest was shown by IKI 2% solution at 72 hours. **Conclusions:** The *Minthostachys mollis* (muña) essential oil 100% pure, has better inhibitory in vitro effect against *Enterococcus faecalis* than IKI 2% solution and ethanol 50% *Minthostachys mollis* essential oil.

**Key words:** *Minthostachys mollis*, *Enterococcus faecalis*, ioduro de potasio.

## INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es un medio que está colonizada por más de 400 especies de bacterias entre aerobias y anaerobias. En donde las bacterias anaerobias superan en número a las aerobias en una proporción que varía entre 10:1 y 100:1 respectivamente, así mismo, estos microorganismos habitan en los dientes, surco gingival, las mucosas, dorso de la lengua y la saliva<sup>1</sup>.

Cabe resaltar que este medio, está caracterizado por su heterogeneidad, variabilidad, cantidad y especificidad, estando colonizado por una flora normal en una relación simbiótica capaz de estimular la respuesta inmune<sup>2</sup>. Si los microorganismos de la flora normal son provistos de condiciones adecuadas y ganan acceso a tejidos normalmente estériles, como la pulpa dental y los tejidos periradiculares, se pueden convertir en patógenos oportunistas. Al mismo tiempo, si la invasión de los tejidos por microorganismos causa daño, entonces se producirá una infección<sup>1,2</sup>.

Por lo cual, los microorganismos juegan un rol importante en el desarrollo y progresión de lesiones pulpares y de tejidos periradiculares. La invasión de los microorganismos provenientes del conducto radicular necrótico hacia el área apical son capaces de producir un cuadro inflamatorio en estos tejidos; por tanto para lograr su cicatrización el objetivo principal del tratamiento endodóntico debe estar enfocado en la eliminación total de la infección así como prevenir la reinfección<sup>2-4</sup>. La persistencia de la inflamación periapical reportada en estudios poblacionales también ha estado asociada a defectos técnicos como obturaciones

defectuosas y restauraciones coronales inadecuadas, presentando tendencia a la recidiva y comprometiendo el éxito clínico del tratamiento<sup>5-7</sup>.

La flora de los conductos con fracaso de tratamiento endodóntico está formada por un limitado número de especies microbianas predominantemente Gram positivas, además se han podido encontrar infecciones polimicrobianas y anaerobios estrictos en los casos donde este fracaso fue acompañado de sintomatología dolorosa<sup>8</sup>. Varios estudios han reportado que en piezas dentarias con signos clínicos y radiográficos de periodontitis apical, los microorganismos predominantes son los *Streptococcus* no mutans, *Enterococcus* y *Lactobacillus*, los cuales al parecer comúnmente sobreviven al tratamiento quimiomecánico del conducto radicular<sup>3, 8-11</sup>. También se han encontrado levaduras en conductos de dientes obturados en los cuales el tratamiento ha fallado<sup>9,12</sup>.

Por consiguiente, el uso del irrigante desempeña un papel importante como parte de la preparación quimiomecánica del sistema de conductos. Si bien la preparación biomecánica facilita la conformación del conducto radicular, la preparación química ayuda en la desinfección y limpieza del sistema de conductos radiculares; esto se debe principalmente a la capacidad de algunos irrigantes - como la solución de hipoclorito de sodio - en disolver tejidos orgánicos, remover, desbridar y eliminar microorganismos<sup>13-15</sup>. También se han sugerido como irrigantes el uso de otras soluciones en el

intento de obtener un agente que promueva una desinfección total del conducto, tales como los compuestos a base de yodo.

La acción de diferentes antimicrobianos ha sido estudiada a lo largo del tiempo para promover la remoción de agentes infecciosos en el conducto radicular<sup>4,15-17</sup>; sin embargo, la flora residente en los dientes con tratamiento de conducto, con enfermedad periapical persistente plantean un reto constante al profesional para mantener el equilibrio de la interacción huésped-patógeno, todo ello, en procura del mantenimiento de un estado fisiológico sin signos y síntomas que nos conduzcan cada vez a una evolución favorable del tratamiento y resultados más predecibles<sup>18</sup>.

La acción antimicrobiana del yodo es rápida, aún en bajas concentraciones, pero el mecanismo de acción exacto aún no es completamente conocido. El yodo penetra en los microorganismos y ataca grupos claves de las moléculas de las células, tales como proteínas, nucleótidos y ácidos grasos, resultando la muerte de la célula<sup>10,19</sup>.

En endodoncia, el yoduro de potasio yodado (IKI) es el componente final de la secuencia de desinfección clásica de la superficie dental. Se requiere de yoduro de potasio para disolver yodo en agua, pero es el yodo el que explica la actividad antimicrobiana de la mezcla, motivo por el cual, el IKI comúnmente ha sido usado como una medicación entre citas.

Molander et al investigaron el efecto pretratamiento del conducto con IKI al 5% antes de la obturación con hidróxido de calcio en dientes con periodontitis apical. Los autores sugirieron que la obturación pretratamiento con IKI desde un punto de vista cuantitativo al parecer no aumentó el poder antimicrobiano, pero sí podría reducir la frecuencia de cepas persistentes de *Enterococcus faecalis*. Similar a otros irrigantes del conducto con actividad desinfectante, los compuestos de yodo en el conducto enfrentan un entorno químico complejo lo cual puede afectar su potencial antimicrobiano<sup>19</sup>.

El efecto de algunos componentes del conducto sobre el IKI durante el tratamiento, sumado a la

dificultad para irrigar efectivamente los segmentos apicales y la inhibición del yodo 30, por sustancias presentes en el conducto, ayudan a entender el fracaso para desinfectar completamente de manera predecible el conducto mediante los compuestos a base de yodo<sup>19</sup>. La fórmula del Yoduro de Potasio Yodado al 2% es: Yodo: 2g.; Yoduro de potasio: 4g; y, agua destilada: 94ml. Sin embargo, se han seguido realizando diferentes estudios para evaluar el impacto antibacteriano empleado cepas y cultivos puros bacterianos de *Enterococcus faecalis*<sup>20</sup>.

En la actualidad el empleo de plantas como tratamiento de diversos males, es muy común, y aunque se registra desde tiempos muy remotos, basándose en creencias populares y conocimientos tradicionales, se han transmitido de generación en generación. Hoy en día, muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente, en base a la extracción de sus principios activos, con diversas actividades biológicas<sup>21-23</sup>.

Entre las cuales tenemos a la *Minthostachys mollis*, nombre científico de la muña, planta nativa que crece en diversas zonas de la serranía peruana, la cual es usada para el tratamiento de dolencias de vías respiratorias y digestivas. La muña habita en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, crece entre 2500 y 3500 msnm, donde existe en abundancia<sup>24-26</sup>.

La composición de la muña es: aceite esencial, glicósidos, mucílagos, saponinas, taninos, alcaloides y esteroides. Además contiene carbohidratos, calcio, fósforo, fierro, trazas de vitamina B1, esencias y mentol.

Diversos estudios han mostrado su efecto antibacteriano<sup>27</sup>, e insecticida, otros han explorado que metabolitos están presentes en su aceite esencial<sup>26</sup>.

Cabe resaltar que el principal objetivo de la terapia endodóntica es remover el tejido contaminado, la eliminación de los microorganismos presentes en el conducto y los túbulos dentinarios, además de prevenir la recontaminación después de la

culminación del tratamiento, es también necesario la correcta elección del irrigante, ya que en el tratamiento endodóntico es un reto, el descontaminar el conducto radicular de manera exitosa, por ello la medicación intracanal podría ayudarnos a conseguir el éxito en la terapia endodóntica.

Motivo por el cual, la presente investigación se realizó para conocer un nuevo producto alternativo, para la desinfección de los conductos radiculares, que además de ser efectivo, también sea menos tóxico y que además se pueda usar de manera frecuente para las diversas patologías pulpares.

El propósito de la presente investigación es determinar el efecto inhibitorio in vitro y del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación con el yoduro de potasio (IKI) sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se aplicó de acuerdo al fin que persigue, experimental comparativa in vitro de acuerdo a su diseño, y se realizó en el laboratorio

de Microbiología, de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, en la ciudad de Cajamarca.

La unidad de muestreo lo constituyó cada repetición realizada con diferentes concentraciones de los aceites esenciales de muña y el yoduro de potasio al 2% en cada placa de Petri con la cepa de *Enterococcus faecalis*, (ATCC 29212) utilizando ambos métodos el de difusión en agar, y el de Kirby-Bauer y se aplicó un diseño experimental con cuatro grupos de trece observaciones cada una y se observó a las 24, 48 y 72 horas de aplicado los tratamientos.

La técnica de recolección de datos fue el método de difusión de discos (Kirby Bauer) utilizando el análisis de varianza (ANOVA) en cada periodo de observación; así mismo, para determinar, la eficacia en los tres periodos de observación, permitiendo determinar la tendencia de la eficacia de cada tratamiento a través del tiempo o periodos de observación.

Para determinar el tratamiento a quien corresponde la mayor diferencia de eficacia se aplicó la prueba Duncan.

**Gráfico N° 1.** Efecto inhibitorio in vitro cuantitativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 100% y 50% y el yoduro de potasio al 2 %, sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, según el diámetro de halo inhibitorio y mediante análisis de varianza.

Hora	Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media Cuadrática	F	P
24	Inter-grupos	264.011	3	88.004	79.650	.000
	Intra-grupos	26.517	24	1.105		
	Total	290.529	27			
48	Inter-grupos	274.455	3	91.485	72.049	.000
	Intra-grupos	30.474	24	1.270		
	Total	304.930	27			
72	Inter-grupos	257.149	3	85.716	97.037	.000
	Intra-grupos	21.200	24	.883		
	Total	278.349	27			

**Interpretación:** Al aplicar el análisis de varianza a los grupos a las 24 horas, 48 y 72 horas, nos informa que los promedios de los halos difieren significativamente según tratamiento aplicado.

**Gráfico N° 2.** Efecto inhibitorio in vitro cuantitativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 100% y 50% y el yoduro de potasio al 2 %, sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, según el diámetro de halo inhibitorio y mediante la prueba de Duncan.

Hora	Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
24 horas	Alcohol	7.2857		
	Aceite Muña 100%		15.0286	
	Aceite muña 50% + Alcohol			15.0286
	Yoduro de Potasio	7.8571		
48 horas	Alcohol	7.1429		
	Aceite Muña 100%		14.9857	
	Aceite muña 50% + Alcohol			14.9857
	Yoduro de Potasio	7.6000		
72 horas	Alcohol	5.8286		
	Aceite Muña 100%		13.4571	
	Aceite muña 50% + Alcohol			13.4571
	Yoduro de Potasio	6.3714		

Al aplicar la prueba de Duncan se observa que las diferencias se dan entre los promedios de los tratamientos: muña al 100% y muña al 50% más alcohol con el resto de tratamientos.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio experimental in vitro se eligió una muestra de 13 observaciones por grupo, a los cuales, se evaluó la sensibilidad in vitro de la bacteria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, frente a dos diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) estas concentraciones utilizadas fueron al 100 % y al 50 % empleando el alcohol como solvente, la concentración del yoduro de potasio (IKI) fue al 2%, el método escogido para evaluar el efecto antimicrobiano fue el de difusión en discos.

La efectividad inhibitoria del aceite esencial de muña al 50% más alcohol ha sido demostrado en el presente estudio, debido a que se produjo una sensibilidad limitada frente al crecimiento del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, según la escala de Duraffourd, donde al hacer la lectura a las 24 horas presentó (10,85mm), a las 48 horas (10,68 mm) y 72 horas (9,37 mm), después de aplicada la prueba de susceptibilidad de difusión de discos, resultados que coinciden con los de Molander A<sup>28</sup> a pesar que el material y método de estudio fueron distintos.

La efectividad inhibitoria del aceite esencial de la muña al 100%, después de la aplicación de la prueba de susceptibilidad de difusión de discos, superó enormemente a las lecturas obtenidas con la muña al 50% más alcohol, tal y como se demuestra en los resultados. Se obtuvo que a las

24, 48 y 72 horas; 15,02 mm, 14,98 mm y 13,43 mm respectivamente. Resultados que coinciden con los de Malpartida F<sup>29</sup> quien obtuvo que a las 24 horas (15 mm) y 72 horas (13,80 mm) sobre las mismas cepas.

Estos resultados obtenidos en ambos estudios tan similares, posiblemente se deba a que en los dos estudios se empleó el mismo método de estudio, lo cual tendría influencia en los resultados, además del efecto antibacteriano que presenta el aceite esencial de muña y su acción frente a las bacterias Gram negativos, lo que se comprueba en el presente estudio.

Sin embargo estos resultados difieren de los obtenidos por Azaña<sup>30</sup> quien obtuvo un halo inhibitorio de 9 mm, diferencia que podría explicarse, ya que dicho estudio empleó una sola lectura además de utilizar un control diferente como es el paramonoclorofenol.

Respecto al yoduro de potasio al 2% (IKI), se obtuvo como resultado a la lectura que a las 24 horas (7,85 mm), 48 horas (7,60 mm) y 72 horas (6,37mm) de halo inhibición, lo cual demostró una efectividad nula según la escala de Duraffourd, resultados aún controversiales ya que existen estudios que refieren que el IKI al 2% es más efectivo que otros irrigantes como es el hipoclorito o clorhexidina. Resultados antagónicos con la presente investigación, ya que el IKI al 2% no presenta eficacia frente a *E. faecalis*.

Así mismo, podemos concluir que los halos de inhibición después de aplicada la prueba de susceptibilidad de difusión de discos, demostró que existe diferencia significativa en el efecto inhibitorio entre los grupos estudiados, quedando demostrado que el uso de la muña al 100% es efectivo frente a la cepa estudiada, siendo una opción natural y no tóxica en el uso de la terapia endodóntica.

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que:

- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), tienen efecto antibacteriano in vitro

frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en su dilución del 50% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a la cepa *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 8 mm con la concentración al 50%, y de 11 mm para el aceite 100% puro, con una significación menor del 5%, cualitativamente, frente a la misma cepa, el aceite esencial puro presentó una efectividad límite; con una significación menor del 5%.

## LISTA DE REFERENCIAS

1. Castillo AM, Liébana J, García A. Las bacterias. En: Liébana J, Bagán J, compiladores. Terapéutica antimicrobiana en Odontoestomatología. Madrid, España: Editorial Smith Kline Beecham; 2001.
2. Liébana J, González M, Liébana M, Parra L. Composición y ecología de la microbiota oral. En Liébana J, compilador. Microbiología Oral. Segunda Edición. España. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2002.
3. Peciuliene V, Teynaud, Balciuniene & Haapasalo. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. International Endodontics Journal 2001: 34; 429-434.
4. Segura J, Jiménez A, Poyato M, Velasco E, Ríos J. Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in an adult Spanish population. International Endodontic Journal 2004: 37; 525-530. 86.
5. Chávez de Paz L, Dahlén G, Molander A, Möller Å, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. International Endodontic Journal 2003: 36; 500-508.
6. Baker N, Liewehr F, Buxton T, Joyce A. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide,

- iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *Enterococcus faecalis* invitro. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol Oral Rad and Endod – OOOOE* 2004 September; 98 (3); 359-364.
7. Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of One- and Two-Visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: A randomized, clinical trial. *Journal of Endodontics* 2004; 10(8); 572–6.85.
  8. Ordinola R; Mendiola C; Valdivia E. Capacidad antimicrobiana In vitro de diferentes soluciones irrigantes y medicamentos endodónticos frente a *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus oralis*. *Visión Dental* 2006; 9; 11-17.
  9. Baumgartner C. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endodontic topics* 2004; 7; 35-51.
  10. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endodontic topics* 2003; 6; 29-56.
  11. Loftus J, Keating A, McCartan E. Periapical status and quality of endodontic treatment in an adult Irish population, *International Endodontic Journal* 2005; 38; 81-86.
  12. Adib V, Spratt D, Ng Y, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *International Endodontic Journal* 2004; 37; 542-551.
  13. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endodontic topics* 2003; 6; 135-159.
  14. Zoletti G, Siquiera, Santos K. Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled teeth with or without periradicular lesions by Culture-dependent and-Independent approaches. *Journal of endodontics* 2006; 32(8); 722-726.
  15. Chávez de Paz L. Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endodontics Topics* 2004; 9; 79-96.
  16. Stuart Ch, Schwartz S, Beeson T, Owats C. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics* 2006; 32(2); 93-98.
  17. Gulabivala K, Patel B, Ecans G, Ling Y. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endodontic Topics* 2005; 10; 103-112.88.
  18. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, compiladores. *Microbiología Médica. Enterococcus y otros cocos grampositivos*. Quinta Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Mosby; 2005.
  19. Chávez de Paz L. Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endodontics Topics* 2004; 9; 79-96.
  20. McDonnell G, Russell D. Antiseptics and Desinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999 January; 12(1); 147-179.
  21. Siani AC, Franco AL, de Sousa MC, Oliveira M, de Sousa. Óleos essenciais / Potencial anti-inflamatório. *Biotecnologia Ciencia y Desarrollo* 1998, 16: 1-11
  22. Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Mintostachys mollis* "Muña". En *Resúmenes de Trabajos de Investigación del I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología-VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas*, Lima, Perú. 1999.
  23. Maldonado A. Cariddi L, Demo M, Calvo D. Propiedades Inmunológicas y Antimicrobianas de decocciones de *Mintostachys verticillata*. Disponible en: <http://www.saic.org.ar/revista/resumenes/401>

- 476.Doc
- 1997:180-182.
24. Salaverry O. La complejidad de lo simple: plantas medicinales y sociedad moderna. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005; 22(4): 245-46.
  25. Roersch C. The marketing of medicinal, aromatic plants and essential oils in the Dominican Republic. Acta Hort (ISHS). 1999; 503:197-219.
  26. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2003;88(2-3): 199-204.
  27. Palacios J, Plantas medicinales nativas del Perú.: 1997:180-182.
  28. Molander A, Reit C, Kvist T. Microbiological status of root –filled teeth with apical periodontitis. Int Endod Journ 1998;31(1):1-7.
  29. Malpartida F. Efecto inhibitor del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (muña) en comparación al Paramonoclorofenolalcanforado Y Gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Lima 2009.
  30. Azaña L. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en