

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO



Facultad de Ciencias de la Salud

“Dr. Wilman Ruiz Vigo”

Carrera Profesional de Estomatología

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE

LAS HOJAS DE *Camellia sinensis* (TÉ VERDE) FRENTE A CEPAS DE

***Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).**

Autor:

Bach. Luz Violeta Tello Guerra

Asesor:

Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez.

Cajamarca-Perú

Julio – 2020

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



“Dr. Wilman Ruiz Vigo”

Carrera Profesional de Estomatología

**EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Camellia sinensis* (TÉ VERDE) FRENTE A CEPAS DE
Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277).**

**Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar el
Título Profesional de Cirujano Dentista.**

Bach. Luz Violeta Tello Guerra

Asesor: Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez

Cajamarca-Perú

Julio – 2020

COPYRIGHT © 2020 by

LUZ VIOLETA TELLO GUERRA

Todos los derechos reservados

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO:

De conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, someto a su evaluación y elevado criterio profesional la tesis intitulada:

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Camellia sinensis* (TÉ VERDE) FRENTE A CEPAS DE *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Con la cual aspiro a obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista.

Es propicia esta oportunidad para manifestarle mi sincero reconocimiento a mi alma máter y a toda su plana docente, que con su capacidad y buena voluntad contribuyeron a mi formación profesional.

Señores miembros del jurado, dejo a su disposición la presente tesis para su evaluación y sugerencias.

Cajamarca, julio del 2020

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUIZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

APROBACIÓN DE TESIS PARA OPTAR TÍTULO

PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

**EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Camellia sinensis* (TÉ VERDE)
FRENTE A CEPAS DE *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).**

JURADO EVALUADOR

Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez
PRESIDENTE

Mg.CD. Lourdes Magdalena Yánac Acedo
MIEMBRO

Mg.CD. María del Pilar Álvarez Quiroz
MIEMBRO

DEDICATORIA

A:

Mi hijo Nicolás Fabián, por ser mi compañero de vida, de risas, tristezas, luchas y sueños, por confiar en mí y en mis capacidades, incluso cuando yo he dudado de ellas, por enseñarme que en la vida no hay nada más importante que la familia, por ser mi motivación como ser humano y profesional, por su inmenso amor.

Mis amados padres: Carmen y Antonio, por hacer de mí la mujer que soy: fuerte e independiente, por ser mis ángeles que me cuidan y guían día a día.

Mi amada Tía Violeta, por amarme infinitamente, por ser mi ejemplo de lucha, valentía y nobleza, por enseñarme a persistir porque el éxito en la vida depende solo de uno mismo.

Mi querido hermano Omar, por enseñarme que las pruebas y dificultades que la vida nos presenta se superan con valentía.

Mis primos y tíos, por acogerme con un cariño sincero, por apostar por mí, por su apoyo incondicional.

Luz Violeta Tello Guerra

AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiar mi vida, por darme la fortaleza para la realización de este estudio.

Al Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez, por su ardua colaboración, quien me ha guiado en el complicado proceso, con paciencia, sabiduría y dedicación, por confiar en mí y animarme, por sus correcciones y consejos que sin ellos no hubiera sido posible la elaboración de este documento.

Al Mg. Blgo. Jorge Enrique Bazán Mayra, por su paciencia, orientación, por compartir sus conocimientos y experiencia, por dedicar parte de su tiempo a la elaboración de este trabajo de investigación, por motivarme a seguir investigando y a no rendirme en el proceso.

Al laboratorio InvBiomed S.R.L., por facilitarnos sus instalaciones en la ejecución de la presente investigación.

A la Dra. Q.F Jéssica Bardales y Q.F Miriam Rodríguez, por su apoyo y aportes en la elaboración de la presente tesis.

A todas las personas que a lo largo de nuestra carrera nos brindaron su cariño y apoyo.

Luz Violeta Tello Guerra.

RESUMEN

Se investigó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico a diversas concentraciones de *Camellia sinensis* (té verde), sobre *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), a través de disco-difusión y concentración mínima inhibitoria, según CLSI., se realizaron 10 repeticiones y se utilizó la clorhexidina al 0.12% como control positivo. El tipo de investigación por su finalidad es básica, por su grado de profundidad es explicativa y por el método de contrastación es experimental.

El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* en concentraciones al 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%, por el método de disco-difusión, presentó halos de inhibición de 17.8 mm para la concentración más alta y 6.2 mm para la concentración mínima respectivamente. El gluconato de clorhexidina al 0.12% (control positivo) presentó halos de inhibición frente a *Porphyromonas gingivalis* de 17.82 mm, además se determinó que la concentración mínima (CMI) capaz de inhibir a *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) fue la concentración de 25% (125mg/ml) de *Camellia sinensis* (té verde).

Los resultados fueron analizados estadísticamente, mediante el Test de Shapiro Wilk, determinando que existe diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la medida del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) en sus diversas concentraciones porcentuales y el Gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Porphyromonas gingivalis*

(ATCC 33277), siendo el gluconato de clorhexidina superior al extracto hidroalcohólico.

Se concluye que, el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (Té verde) presenta efectividad antibacteriana, pero no mayor a la del gluconato de clorhexidina al 0.12%.

Palabras claves: Efecto antibacteriano, extracto hidroalcohólico, *Camellia sinensis* (té verde) y *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

The *in vitro* antibacterial effect of hydroalcoholic extract at various concentrations of *Camellia sinensis* (green tea) on colonies of *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) was investigated. Through disc-diffusion and minimum inhibitory concentration, according to CLSI, 10 repetitions were performed and chlorhexidine was used as a positive control. The type of research for its purpose is basic, for its depth is explanatory and for the method of contrast is experimental. The hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis* in concentrations 100%, 50%, 25%, 12.5% and 6.25%, by the disc-diffusion method, presented inhibition halos of 17.8 mm for the highest concentration and 6.2 mm for the minimum concentration respectively. Chlorhexidine gluconate at 0.12% (positive control) presented inhibition halos against *Porphyromonas gingivalis* of 17.82 mm, in addition it was determined that the minimum concentration (MIC) able to inhibit *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) was the concentration of 25% (125mg/ml) of *Camellia sinensis* (green tea).

The results were statistically analyzed using the Shapiro Wilk, determining that there are significant differences ($p < 0.05$) between the measurement of the inhibition halo of the hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis* (green tea) in its various percentage concentrations and the chlorhexidine gluconate at 0.12% on *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), being the chlorhexidine gluconate superior to the hydroalcoholic extract. It is concluded that the hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis* (Green tea)

has antibacterial effectiveness, but not greater than that of chlorhexidine gluconate at 0.12%.

Key words: Antibacterial effect, hydroalcoholic extract, *Camellia sinensis* (green tea) and *Porphyromonas gingivalis*.

CONTENIDO

PRESENTACIÓN	IV
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTO	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
CONTENIDO	XII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE GRÁFICOS	XVI
LISTA DE FOTOS	XVII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II: MARCO CONCEPTUAL	5
2.1. Antecedentes de la investigación.....	5
2.2. Periodontitis	9
2.3. <i>Camellia sinensis</i> (té verde)	13
2.4. Gluconato de clorhexidina 0.12%.....	18
2.5. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	23

2.5.1 Clasificación científica.....	23
2.6. Definición de términos básicos	25
CAPÍTULO III: MÉTODOS	27
3.1. Tipo de investigación	27
3.2. Operacionalización de variables:	27
3.2.1. Población: Conformado por <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277)...	28
3.2.2. Criterios de selección del grupo de estudio	28
3.3. Diseño de contrastación de la hipótesis.....	29
3.4. Técnicas de recolección de datos	29
3.5. Instrumento de recolección de datos.....	29
3.6. Técnica de análisis de datos	30
3.7. Consideraciones éticas.....	30
3.8. Proceso	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	43
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	50
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS	56

ANEXOS	66
ANEXO 1: TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS.....	66
ANEXO 2: TEST DE CMI.....	67
ANEXO 3: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DIFUSION DISCOS AGAR.....	68
ANEXO 4: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO CONCENTRACIÓN MINIMA INBIHITORIA	69
ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	70
ANEXO 6: REGISTROS FOTOGRÁFICOS	71

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> (té verde) en concentraciones de 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100%, en milímetros	45
TABLA 2: Concentraciones de <i>Camellia sinensis</i> (té verde), promedio escala Duraffourd.....	46
TABLA 3: Concentración Mínima Inhibitoria del Extracto Hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> (té verde) frente a colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277)	47
TABLA 4: Efecto Antibacteriano del Extracto Hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> (Té Verde) En Concentraciones De 6,25%,12.5%,25%, 50% Y 100% en Milímetros y CIM.....	48
TABLA 5: Prueba de Shapiro- Wilk de la media de los halos de inhibición del Extracto Hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> en concentraciones al 100%, 50%, 25%,12.5%, 6.25% en comparación a la media de los halos de inhibición del gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC33277).....	49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> (Té verde) en concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%, gluconato de clorhexidina al 0.12% (control positivo) y alcohol de 70° (control negativo).....	50
--	----

LISTA DE FOTOS

Foto 1:Recolección de las hojas de <i>Camellia sinensis</i> (té verde)	71
Foto 2: Pulverización de <i>Camellia sinensis</i> (té verde)	71
Foto 3: Tamizaje de <i>Camellia sinensis</i> (té verde)	71
Foto 4: Pesaje de 20 g de la muestra vegetal (té verde)	72
Foto 5: Acondicionamiento de 100 ml. de alcohol.....	72
Foto 6: Colocación del imán en el contenido vegetal.....	72
Foto 7: Forrado con papel aluminio y colocado en agitador magnético.....	72
Foto 8: Filtrado del extracto hidroalcohólico con gasas estériles.....	73
Foto 9: Solución filtrada llevada a rotavapor por 1 hora.....	73
Foto 10: Solución llevada a un frasco ámbar	73
Foto11: Instrumentos para preparar Agar Schaedler.....	74
Foto12: Agar Schaedler preparado	74
Foto 13: Esterilización de agar	74
Foto 14: Empaque de cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277)	74

Foto 15: Incubación por 2 horas en ambiente de microaerofilia a 37°C.....	74
Foto 16: Agar sangre enriquecido con vitamina-K1, previa esterilización.....	74
Foto 17: Preparación Agar enriquecido con sangre de cordero.....	75
Foto 18: Distribución del Agar Schaedler en Placas Petri.....	75
Foto19: Anaerobiosis.....	75
Foto 20: Pipeta con cepa liofilizada	75
Foto 21: Inoculación de la superficie de las Placas Petri	75
Foto 22: Control de esterilidad y Control de crecimiento bacteriano.....	75
Foto 23: Grupo problema: extracto hidroalcohólico.....	76
Foto 24: Impregnación de discos con 20 μ L de los preparados	76
Foto 25: Grupo Experimental y grupo control.....	76
Foto 26: Placas Petri con discos embebidos en extracto de Té Verde.....	76
Foto 27: Placas Petri en la jarra con sobres de anaerobiosis.....	76
Foto 28: Incubación de Placas Petri a 36°C durante 4 días	76
Foto 29: Halos de inhibición, presentes en placas Petri.....	77
Foto 30: Agar Müeller Hinton preparado	77
Foto 31: Cultivo puro turbidez final de 0,5 de la escala de Mc Farland.....	77

Foto 32: Extracto hidroalcohólico de té verde en concentraciones 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% (grupo problema).....	77
Foto 33: Cultivo puro, turbidez final de 0,5 de la escala de Mc Farland.....	77
Foto 34: Incubación por 3 a 4 horas en ambiente de microaerofilia a 35°C.....	77
Foto 35: Lectura e interpretación.....	78

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Durante siglos se ha utilizado la medicina tradicional, contribuyendo de gran manera en la salud humana.¹ El estudio científico herbolario y botánico medicinal permite un conocimiento más amplio de las plantas conllevando a que los productos naturales sean identificados como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos.²

Al mismo tiempo las investigaciones científicas han logrado adaptarse a la búsqueda de medicamentos de procedencia herbaria, para el tratamiento de diversas patologías, estos principios activos originarios de las plantas son de interés en esta investigación, por la razón de que incluyen reemplazos fiables y eficaces frente a agentes microbianos, que muchos de los fármacos de origen sintético; siguiendo esta inclinación las patologías odontogénicas no son la excepción, es así que se está dando gran importancia al estudio de fito- terapéuticos.^(1,2,3)

La *Camellia sinensis* (té verde) tiene propiedades antimicrobianas similares a los antisépticos usados en clínica,⁴ diversas investigaciones han reportado que el té verde conserva en su estructura taninos,⁵ flavonoides,⁶ gomas,⁷ catequinas y proteínas⁸, que le brindan cualidades antivirales, antibacterianas, anticancerígenas, antidiabéticas, antiinflamatorias y antitumorales, expresando un extenso rango de efectos fisiológicos y farmacológicos sobre ciertas patologías^{9,10}

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽²⁾, las afecciones bucodentales, como periodontitis crean un dilema de salud pública que, en su forma más grave, genera la movilidad de los dientes hasta llegar a la pérdida de la pieza dentaria

(periodontitis), es considerada la undécima enfermedad más prevalente a nivel mundial. Las principales causas de periodontitis son la mala higiene bucal y el consumo de tabaco.¹⁰

Uno de los principales agentes microbianos causales de la periodontitis es la *Porphyromonas gingivalis*,^(11, 12) la cual aprovecha la presencia de la placa bacteriana, los factores hormonales y ciertos medicamentos para desarrollarse.⁽¹³⁾

La OMS desde el 2014⁽¹⁾, canaliza la necesidad de incorporar a la salud los procedimientos de la medicina ancestral. Así se puede contribuir a la solución del problema de salud, de este modo mitigar la costosa y complicada adquisición de fármacos realizados a base de insumos sintéticos, los que han reemplazado a muchas de las tradicionales y bien establecidas drogas vegetales.⁽¹⁾

Uno de los tratamientos para la periodontitis es el uso de antisépticos orales, el más recomendado, es el gluconato de clorhexidina, el cual es el más usado, y que se ha unido con éxito a colutorios, geles y barnices.

Su alta sustentividad facilita una eficacia superior a otros componentes, sin embargo, presenta efectos adversos o secundarios, que son reversibles, tales como: tinciones en los dientes, hipogeusia y ageusia, etc.⁵

En consecuencia, la presente investigación busca mediante un estudio *in vitro* sobre el extracto hidroalcohólico de hojas de *Camellia sinensis* (té verde), determinar si posee cualidades antimicrobianas que inhiban el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* principal agente de la gingivitis y periodontitis.

Por lo dicho anteriormente, se planteó la siguiente interrogante:

¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde) muestra eficacia antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277?

Teniendo como objetivo general:

Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Y como objetivos específicos:

- Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* mediante el método de disco difusión en agar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) en concentraciones porcentuales: 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100%.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) en concentraciones porcentuales: 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100%.
- Comparar la eficacia antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde) según método de disco difusión en

agar y CMI; con el Gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Por este motivo se postuló la siguiente hipótesis:

- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones porcentuales de 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100% sí posee efecto antibacteriano frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

CAPITULO II: MARCO CONCEPTUAL

2.1. Antecedentes de la investigación

Existen estudios que reportan que el té verde posee taninos, flavonoides, gomas, polifenoles (Epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina, epicatequina galatoy epicatequina) y proteínas que le brindan un poder contra diversos microorganismos, así tenemos:

Funosas E. *et al.*⁹ (2005), en su investigación “Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica”, donde se buscó evaluar la eficacia antibacteriana del extracto de té verde, en la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, se evaluaron 50 personas de ambos sexos, con periodontitis crónica, la metodología se basó en extraer muestras de placa subgingival con conos de papel estéril del fondo de las bolsas periodontales, luego se sembró en Agar Schlaeder por 5 días, el resultado determinó que el extracto de té verde es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus spp* y *Porphyromonas gingivalis*. Concluyeron que los polifenoles de *Camellia sinensis*, inhiben la acción de la colagenasa, el desarrollo y la adherencia celular de *Porphyromonas gingivalis*.

Jiménez L.¹⁰ (2008) en su investigación “Uso del Té verde como coadyuvante en el tratamiento de las bolsas periodontales en pacientes de la Clínica de Especialidades Odontológicas” en San José - Costa Rica, donde su objetivo

fue determinar la utilidad clínica del “té verde” como enjuague; la metodología usada consistió en dividir al azar a los pacientes en dos grupos, el primero sin enjuague y el segundo con enjuague, los resultados mostraron en ambos grupos disminución en las bolsas periodontales, entre ambos grupos las diferencias fueron muy leves, por lo que se puede decir que el enjuague a base de té verde no muestra efectividad clínica, con respecto al índice de hemorragia gingival, ambos grupos mostraron mejoría; así mismo, a los que se les aplicó el enjuague, dicha mejoría fue significativamente mayor, por lo que se concluye que el enjuague tiene efectividad clínica en lo que se refiere a la disminución de la hemorragia gingival.

Okamoto *et al* ¹¹ (2004), en su investigación “Efecto inhibitorio de las catequinas del té verde sobre las cisteínas proteinasas en *Porphyromonas gingivalis*”, realizada en Yokohama- Japón cuyo objetivo fue examinar las catequinas y sus derivados en las actividades de Arg-gingipain y gingipain, la metodología se apoyó en el cultivo de las cepas en agar sangre de cordero, mientras que para el efecto inhibitorio de las catequinas sobre la cisteína-HCl se añadió sulfato de amonio al cultivo hasta una saturación del 70%, la proteína precipitada se recogió por centrifugación a 10.000 rpm. durante 20 minutos. Los resultados señalaron que las Catequinas y sus derivados (EGC, el EGCG y ECG) son encargados de la inhibición antibacteriana, concluyeron que tienen el potencial para reducir el daño periodontal ocasionado por las proteínas Arg-gingipain (Rgp) y Lys – gingipain (Kgp) de la *Porphyromonas gingivalis*.

García K. ¹² (2015), en su estudio “Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia sinensis* (té verde) usado como colutorio, sobre placa bacteriana y

saliva” el objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de una infusión de *Camellia sinensis* usada como colutorio sobre biofilm y saliva, se preparó una infusión al 20%; se trabajó con 160 escolares, a la mitad de ellos se les aplicó el enjuagatorio y a la otra mitad solución salina, la eficacia antibacteriana lo determinaron mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), las tomas se realizaron antes de la aplicación, después y a los 10 minutos, los resultados mostraron actividad antibacteriana en biofilm y saliva, la liberación del efecto se prolongó hasta 10 minutos después de la aplicación, concluyeron que la infusión muestra eficacia antibacteriana en saliva y biofilm, incluso después de los 10 minutos de su aplicación.

Sandoval M.¹³ (2018), en su investigación “Efecto inhibitorio del aceite esencial de romero vs té verde frente *Porphyromonas gingivalis*. Estudio *in vitro*” en Quito, el objetivo fue determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de “romero” vs el “té verde”, la concentración del aceite de “romero” fue de 100% y para el extracto acuoso de “té verde” fueron de 100% y 50%, se utilizaron 10 cajas Petri, donde se dispusieron en: 1 disco con aceite de romero, 1 disco con té verde al 50%, 1 disco con té verde al 100% y 1 disco con el control positivo (clorhexidina al 0,12%). Los resultados revelaron que el té verde al 100% evidenció halos sensibles de 16mm, siendo comparativos a los halos de clorhexidina, y por encima de los halos de 10 mm del aceite de romero. Inferieron que: el “té verde” es más eficaz frente a la *Porphyromonas gingivalis*, que el aceite de “romero”.

Nakata. ¹⁴ (2007) en su investigación “Efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales” con la finalidad de determinar, el efecto antimicrobiano *in vitro* de las soluciones *Camellia sinensis* (té verde) de cuatro marcas (A, B, C y D), se reunió saliva no estimulada de 40 jóvenes universitarios luego se procedió a sembrar en medio de Agar Tripticasa soya, después se utilizó el método de difusión por discos para las concentraciones de té, el control positivo (Amoxicilina) y el negativo (agua), se registró que en las cuatro marcas de té verde mostraron halos de inhibición, además notaron la presencia de polifenoles, por medio de la espectrofotometría-infrarrojo, los resultados concluyeron que sí hubo acción antibacteriana para la microflora salival mixta, y tuvo diferencias entre las marcas, sin embargo es necesario la continuación de los estudios para comprobar su efecto antimicrobiano *in vivo*.

Moromi H. et al ¹⁵ (2014), realizaron un estudio” Efectividad *in vitro* e *in vivo* de un gel a base de *Camellia sinensis* “té verde” frente a microorganismos de importancia en procesos periodontales” en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima) con la finalidad de determinar la efectividad antimicrobiana sobre: *Prevotella loeschi*, *Peptostreptococcus anaerobius* y *Capnocytophaga* en concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25%, y para el gel fue de 2%, así mismo sólo se apreció acción en el sitio de contacto (gel) y en pacientes se determinó una mejoría del índice gingival (Loe y Silness). Se llegaron a la conclusión que el extracto de “té verde” presenta actividad antibacteriana, en las concentraciones utilizadas mientras que para el gel sólo

mostró efecto en el lugar de contacto, además evidenció mejoras en los índices gingivales hasta la segunda semana de evaluación.

Paredes N.¹⁶ (2009), en su investigación “Efectividad antibacteriana *in vitro* de una infusión a base de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* sobre microbiota salival mixta” con el objetivo de establecer la efectividad antibacteriana “*in vitro*”, recogió saliva no estimulada de 30 alumnos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, utilizando el método de difusión por discos para las soluciones de té verde, muña, té verde y muña, y el control positivo (Clorhexidina), las placas se incubaron a 37° C / 24 horas. Los resultados demostraron la efectividad antibacteriana del extracto a base de “té verde” y “muña” sobre la flora salival mixta, se distinguió actividad antibacteriana baja con respecto a la infusión de “té verde”, y mucho menor en relación a la clorhexidina. Se concluyó que la media de efectividad del “té verde” es menor que de la clorhexidina.

2.2. Periodontitis

La enfermedad periodontal es de elevada prevalencia mundial afecta a casi la mitad de los adultos en el Reino Unido y Estados Unidos, lo adolecen el 60% de los mayores de 65 años¹⁷, en nuestro país, según los datos del MINSA, indican que se registraron 637,078 casos es decir, un 15% a 20% de los adultos en edad media (33 - 45), estos resultados se incrementan considerablemente con el envejecimiento y alcanza su índice más alto cuando las personas llegan a la sexta década de la vida.¹⁸

Dicho padecimiento se caracteriza por un proceso inflamatorio de tipo infeccioso polimicrobiano, que es nocivo con los tejidos de soporte dentario, los ligamentos, cemento y hueso alveolar.¹⁹

Es de origen inflamatorio causada por el sobre crecimiento de la placa dentobacteriana,¹⁸ se caracteriza por la pérdida de inserción del tejido conectivo y la pérdida del hueso de soporte, puede tener inicio en la etapa adolescente y prolongarse por toda la vida. Inicia con variaciones clínicas inflamatorias ubicadas en la encía (gingivitis), luego compromete a estructuras más profundas del periodonto formando sacos periodontales que genera un medio ideal para la colonización (placa bacteriana).¹⁹

La placa bacteriana interactúa en los arquetipos del periodonto como son las fibras del ligamento periodontal y el hueso alveolar, de esta interacción el daño es irreversible en consecuencia se produce; hiperplasia gingival, eritemas, edemas, recesión gingival, movilidad y reabsorción ósea hasta la pérdida de inserción, siendo este el síntoma clínico más evidente, generando consecuencias estéticas, fisiológicas y psicológicas en los pacientes.¹⁹

La periodontitis es tratada a través de diversas estrategias que están orientadas a reducir la carga bacteriana entre ellas tenemos: las mecánicas (raspado y alisado radicular) y las químicas mediante el uso de quimioterapéuticos o antisépticos orales (bacteriostáticas y bactericidas), también existen otras alternativas como la Fitoterapia, pero éstas aún están en investigación.²⁰

2.2.1. Microorganismos implicados

Los microorganismos infectan la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar; los cuales son constituyentes del periodonto y brindan al diente protección, unión, soporte y la estancia en el alveolo, entre estos asociamos a: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinobacillus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Peptostreptococcus micros* y *Espiroquetas (Treponema denticola)*; también se incluyen nuevos patógenos periodontales, tales como; *Fastidiosum fretibacterium*, *Alocis filifactor*, y *Eubacterium spp*, *Selomona sputigena* e incluso *Candida albicans*.²¹ La presencia de estos microorganismos forman parte del biofilm en el área cervical de los dientes y continúa el desarrollo hacia la zona apical, cambiando la flora, por tanto el daño sucede de manera paulatina.²²

2.2.2. Factores Etiológicos^{23, 24}

- Deficiencia en la Higiene Oral.
- Restauraciones sobre contorneadas.
- Tabaquismo.
- Diabetes Mellitus.
- Prótesis mal adaptadas.
- Mal posición dentaria.
- Ortodoncia.

2.2.3. Clasificación

Según la Asociación Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP) la nueva catalogación se basa en la severidad, complejidad y extensión. Uniendo periodontitis crónica y periodontitis agresiva (localizada: menor del 30% de piezas afectadas y generalizada), mantiene periodontitis necrosante (EPN) e incorpora la periodontitis como enfermedad sistémica, a su vez se organiza en 4 estadios, desde la I (menos grave), hasta la IV (grave) y en grados A, B y C.²⁴

Donde se incluyen la pérdida de inserción interdental y de hueso (horizontal y vertical), la profundidad al sondaje y defectos de furca (tipo II o III), adiciona los niveles de biofilm, además incluye al paciente fumador (10 cigarrillos) o diabético (hemoglobina glicosilada mayor del 7%).²⁴

La característica clínica más notoria en la periodontitis crónica es la formación de la bolsa periodontal que se inicia con un cambio inflamatorio en la pared de tejido que se une del surco gingival, produciendo exudado inflamatorio celular y el fluido provoca la degeneración del tejido conectivo adyacente y de las fibras gingivales.²⁵

La profundización inicial de la bolsa se produce entre el epitelio de unión y el diente, o por la segmentación intraepitelial en el epitelio de unión.²⁵

2.3. *Camellia sinensis* (té verde)

Nombrado en honor a George Joseph Camel, nativa del norte de la India y del sur de China, luego se expandió a toda la zona oriental de Asia (China, Japón, Java, Ceilán, e Indonesia), soporta los 2.200 msnm. Actualmente es cultivada en muchos lugares tropicales y subtropicales de todo el mundo, llegó al Perú (Cuzco) con el inicio de la conquista española. Se multiplican a través de semillas o por vía vegetativa, su capacidad de reproducción está limitada; y prefieren de un clima cálido y húmedo de suelo acidificado.²⁶

2.3.1. Taxonomía²⁷

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Ericales.

Familia: Theaceae.

Tribu: Theae.

Género: *Camellia*.

Especie: *sinensis*.

2.3.2. Descripción botánica

Arbusto: Perenne, ramificado y que puede llegar a medir 10 metros de altura en su estado silvestre.²⁸

Hojas: Color verde oscuro brillante (contienen un 5-6% de agua y un 4-7% de sales minerales, especialmente ricas en potasio y manganeso) mínimamente pecioladas, enteras, oval-oblongas, de 5 - 10 cm de largo y 2-4 cm de ancho, acuminadas, dentadas en los dos tercios apicales, finalizando cada diente en una glándula. Muestran el nervio central muy perceptible.²⁷

Flores: Pequeñas, blancas, yemas, solitarias y caídas, agrupadas de tres en tres o en pares.

Fruto: Forma de una cápsula esferoidal o trigona, ligeramente aplastada, que contiene semillas globulares del tamaño de una avellana.

2.3.3. Producción

Su reproducción se da a través de semillas, su fertilidad está limitada a 6 meses; y requiere de un clima cálido y húmedo de suelo ácido.²⁷

2.3.4. Propiedades *Camellia sinensis* (té verde)

Los estudios han evidenciado que *Camellia sinensis* (té verde) tiene excelentes propiedades entre ellas: los antioxidantes que fortalece el sistema inmunológico, además de ello posee actividad antibacteriana, anti mutagénica, antidiabética, antiinflamatoria y antitumoral, en el área odontológica el flúor y los bioflavonoides evitan la aparición de caries, donde se precisó una significativa acción inhibitoria sobre cepas de

Streptococcus spp y *Pseudomonas spp.*, además se determinó que algunos agentes causantes de enfermedades periodontales no eran sensibles a la acción inhibitoria del “té verde”^{26, 27}

Otro agente importante es la cafeína que actúa por la teofilina a nivel del (SNC), estimulando el estado de vigilia (efecto vasodilatador e inotrópico) en consecuencia disminuye la etapa de fatiga, los efectos pueden observarse a nivel broncopulmonar (sistema respiratorio)²⁸

Asimismo ha evidenciado en estudios que en extracto acuoso y alcohólico contiene las epigallocatequinas (GTP) que poseen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias; en fermentación completa, presenta propiedades de protección cardiovascular (flavonoides) y estabilización de insulina; como infusión se lo considera reductor de grasa, energizante y disminuye dolores de cabeza, en fermentación incompleta y escaldado, tiene cualidades anticancerígenas (antioxidantes), además su mayor contenido son los aceites esenciales (polifenoles) que son volátiles, análogamente ofrece beneficios para el tratamiento de halitosis.^{27, 28, 29}

2.3.5. Principio Activo

Los principios activos terapéuticos son: bases xánticas (cafeína y teofilina), componentes polifenólicos y aceites esenciales; la efectividad de las bases xánticas se debe meritoriamente a la cafeína (o teína), la teofilina, teobromina y adenina; por otro lado, los flavonoides más distintivos son el *kaempferol*, las *catequinas* y la *miricetina*,

simultáneamente los taninos condensados se ubican libres y combinados en las bases xánticas, los ácidos fenólicos más conocidos son el ácido *clorogénico*, *el cafeico* y *el gálico*, asimismo también se encuentran los aminoácidos libres tales como; 5-Metil-glutamina o theanina,, vitaminas del grupo B y sales minerales (destacando el fluoruro).³⁰

2.3.5.1.Catequinas Polifenólicas.

Los principales activos que producen efectos beneficiosos para la salud oral son cuatro catequinas polifenólicas; tales como el galato de epigalocatequina (EGCG) o epigalocatequina-3-galato (propiedad antiinflamatoria y antibacteriana), galato de epicatequina (ECG), catequina epigalato (EGC), epicatequina (CE) catequinas (C) y epicatequinas (EC)²⁷ en su juventud las hojas contienen más cantidad de catequinas y en la madurez contiene más cafeína, pero éstas varían de acuerdo al clima, la cosecha, la edad de las hojas y temperatura, sin embargo esto no afecta la efectividad antibacteriana proveniente de las hojas.³¹

El galato de epigalocatequina (EGCG) es un compuesto monomérico bioactivo del grupo de las catequinas (polifenol), que inhibe la formación biofilm (carbohidratos fermentables), y previene infecciones,³¹ reduciendo la evolución de la enfermedad periodontal por tanto permite inhibir el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.³² en otras palabras priva la adherencia del microorganismo a la superficie

de las piezas dentarias por reducción de la hidrofobia, además de impedir la aparición de caries por la reducción de ácido.³⁴

La administración oral es menos eficaz, ya que durante el tracto puede sufrir degradaciones lo que hace que la absorción sea insuficiente, sin embargo, en conjunto con la cafeína, aumenta el gasto energético y reduce la ingesta, en el (SNC) actúa sobre la noradrenalina.³⁵

2.3.6. Composición química^{13,36*}:

Componentes	Valor
Teaflavinas (%)	0,78
Tearubiquinas (%)	8,02
Sustancias altamente polimerizadas (%)	11,19
Polifenoles totales (%)	20
Cafeína (%)	3,51
Aminoácidos (%)	1
Proteínas (%)	20,60
Lípidos (%)	2,50
Carbohidratos (%)	32,10
Humedad (%)	6
Calcio	470
Fósforo (mg/100mg)	320
Hierro	17,40
Sodio	3
Potasio	2,000

Vitamina A (U /100 g)	900
Vitamina B1	0,10
Vitamina B2	0,80
Niacina 10	10
Ácido gálico (%)	0,15
Epilagato de catequina (%)	0,57
(*) catequinas (%)	0,18
Galato Epigalocateuina (%)	1,51

*Fuente: Área Infusiones. Dirección de Industria Alimentaria, en base a UPASI. Tea Research Foundation. Laboratorio de Lípidos y Antioxidantes, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Chile. Santiago de Chile.³⁷

2.3.7. Efectos Adversos

No se han hallado reacciones adversas, no obstante, en el caso de su consumo en altas dosis, en medicaciones cotidianas, prolongadas o en personas altamente sensibles, realmente puede ocasionar reacciones desfavorables como insomnio, ansiedad y síntomas provocados por el consumo de cafeína, pero se debe tener en cuenta que generalmente acostumbra ser leves y fugaces.^{31,34, 35}

2.4. Gluconato de clorhexidina 0.12%

La clorhexidina apareció en el Reino Unido en la década de 1940, cuando los científicos realizaban una investigación antipalúdica; la pusieron en el

mercado como fungicida para enfermedades de la piel en 1954, luego se usó en otros campos de la medicina.³⁸

En el campo de la odontología, se puede utilizar para reducir la carga bacteriana en la cavidad oral; en la especialidad endodoncia⁵⁷, se utiliza como irrigante de conductos para disminuir la carga bacteriana del diente. Debemos mencionar que el estudio que dio auge a la clorhexidina en el mundo de la periodontología fue el estudio realizado por Løe y Schiott³⁸ en 1970, en el que se usó diariamente gluconato de clorhexidina al 0.2%, durante 60 segundos, si no usa un cepillado regular, puede inhibir la formación de placa y el desarrollo de gingivitis.^{39, 58}

2.4.1. Características y Estructura química

La clorhexidina es una molécula dica-tiónica simétrica, que consiste en la formación de dos anillos, cuatro clorofenil y dos grupos de bisguanida, enlazada por una cadena central denominada hexametileno, es decir cada extremo se une un radical paraclorofenil (2 anillos - 4 clorofenil), dando como resultado el paraclorofenilbiguanida.^{38, 40}

Al ser compuesta por una base dicatiónica su pH es superior a 5.5 a 7, sin embargo, se neutraliza en presencia de iones y aniones, posee dos cargas positivas en cada uno de los lados del puente hexametileno; podemos manifestar que su naturaleza la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es excelente para su efectividad, del mismo modo presenta efectos secundarios colaterales.⁴⁰

La clorhexidina se conserva más estable en su forma de sal y su preparación más conocida es la de di-gluconato por su elevada solubilidad en agua.⁴¹

2.4.2. Mecanismo de Acción

La clorhexidina se adhiere firmemente a la membrana extra celular bacteriana, desestabilizando y permitiendo la permeabilidad de enzimas peri plasmáticas, mientras que en la pared interna no permite la adsorción de los elementos intracelulares (llamado efecto bacteriostático), en condensaciones elevadas produce la llamada precipitación del citoplasma bacteriano y el deceso celular (efecto bactericida).⁴⁰

Se adsorbe velozmente a las superficies de contacto, incluidos los dientes, proteínas salivales y a la hidroxiapatita.^{41, 42}

La clorhexidina adsorbida se libera paulatinamente de 8 a 12 horas de forma activa, pueden reponerse aglomeraciones bajas de clorhexidina pasadas las 24 horas, por lo que evita la colonización bacteriana durante ese lapso, su pH óptimo está entre 5.5 y 7.0.⁴¹

En relación al pH, lo estabiliza en 5.0 y 8.0, y esta sustancia se activa al encontrar bacterias Gram+ y Gram-.⁴²

2.4.3. Farmacocinética

Los análisis farmacocinéticos sobre clorhexidina, arrojan que el 30 % del principio activo, se guarda en la cavidad oral después del enjuague,

liberándose paulatinamente en los fluidos orales. Los estudios en animales han diagnosticado que el fármaco tiene absorción limitada en el tracto gastrointestinal.⁴³

El nivel de clorhexidina en plasma en humanos es de 0.206 microgramos por gramo, que alcanza los 300 microgramos de clorhexidina luego de 30 minutos. No se localizaron niveles detectables en plasma de clorhexidina después de 24 horas de haberlas ingerido. La evacuación de clorhexidina se hace por las heces (90 %); menos del 1% se expulsa por la orina.⁴⁴

2.4.4. Concentraciones

Las investigaciones sobre la clorhexidina revelan que se presentan en dos concentraciones, al 0.12 % y al 0.2 %, la posología menciona que se debe realizar un enjuague con 10 mL del producto a una concentración del 0.2 % y de 15 ml al 0.12 %, debido a que la liberación total de la dosis es decir al 0.2 %, libera 20 mg y al 0.12 % libera 18 mg, esto nos permite percatarnos que ambas concentraciones porcentuales son efectivas.⁴¹

2.4.5. Formas comerciales y presentaciones

La eficacia de clorhexidina depende de su forma de presentación, así se puede hallar: Colutorios, dentífricos, geles, barnices, aerosoles, depósito de liberación lenta, chicles, etc. Se aconseja el uso del método en colutorio para la mayoría de circunstancias como coadyuvante de la higiene bucal. Se considera que el modo de presentación es en solución

al 0.12% para enjuagues de 15 mL durante 30 segundos y al 0.2% para enjuagues de 10 mL.^{37,39,42}

2.4.6. Indicaciones

La clorhexidina está sugerida como agente anti-placa, el cual sirve para tratar la gingivitis y periodontitis, además de su uso en cirugía periodontal, como irrigador en alveolitis, del mismo modo como desinfectante en la inflamación de la mucosa bucal por prótesis totales o removibles (Candidiasis sub-placa), para el tratamiento de ulceraciones, aftas y como auxiliar en el tratamiento de halitosis. Es necesario tener en cuenta su uso dos veces al día de forma oral (colutorio), debe ser utilizado por 30 segundos. Luego del enjuague, no debe ingerirse, si fuese así debe ser expectorado.^{43,45}

2.4.7. Efectos secundarios

Los efectos secundarios más habituales en la utilización de la clorhexidina son las discromías dentarias, partes blandas de la mucosa, dorso de la lengua y restauraciones. Otro efecto supletorio de los enjuagues con clorhexidina es la variación del sentido del gusto como la hipogeusia, disgeusia, la sensación de quemazón, sequedad de tejidos blandos, lesiones descamativas y ulcerosas de la mucosa gingival, además del desagradable sabor amargo, por otra parte, puede haber una interacción potencial con el disulfiram.^{42,44}

2.5. *Porphyromonas gingivalis*.

2.5.1 Clasificación científica^{45, 44}

Filo: Bacteroidetes

Clase: Bacteroidetes

Orden: Bacteroidales

Familia: Porphyromonadaceae

Género: Porphyromonas

Especie: *P. gingivalis*.

Su nombre procede del griego “*porphyreos*” que significa púrpura y el griego “*monas*” que significa unidad, es uno de los principales agentes de la enfermedad periodontal, se halló en el 85,75%⁴⁵ de las muestras de placa subgingival es un bacilo Gram negativo (Gram -) anaerobio, facultativo – estricto de pigmentación negra, sus diversos componentes y su grado de capacidad para producir una enfermedad la hacen extremadamente agresiva.⁴⁴

El hábitat para su desarrollo es el surco gingival, interactúa con el huésped produciendo un deterioro pausado, a través de sus factores de virulencia como son:

- Fimbrias: Son apéndices superficiales delgados y proteináceos que sobresalen de la membrana externa, se dividen en principales y menores esta última causa la reabsorción ósea.⁴⁴

- Cápsulas: Son adhesinas que ayudan a la encapsulación, se correlaciona con el aumento de la resistencia a la fagocitosis y a la inducción de los leucocitos polimorfonucleares.⁴⁴
- Lipopolisacáridos (LPS): Causa el desequilibrio del sistema inmune innato de los mamíferos, brinda mantenimiento, integridad y estructural, controla la entrada de moléculas hidrofóbicas y productos químicos tóxicos.⁴⁴
- Ácidos lipoteicoicos: Son enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas que permite que las bacterias prosperen en la cavidad oral.
- Hemaglutininas y las gingipaínas: Están relacionadas en la degradación de las proteínas del colágeno y son responsables de la inflamación y destrucción del tejido de soporte.⁴⁵
- Proteínas y vesículas de la membrana externa: Se compone de dos membranas celulares, la membrana externa (OM) y la membrana interna (IM), funciona como la barrera selectiva que ofrece protección y permite el movimiento de varias sustancias a través de proteínas⁴⁵, están en constante interacción con los tejidos del periodonto, es decir induce la respuesta del huésped al producir citoquinas, además inhibe los mecanismos de protección, asimismo necesita la fermentación de aminoácidos para su producción de energía, una cualidad importante para su crecimiento y desarrollo en las bolsas periodontales, donde la disponibilidad de azúcar es baja.⁴⁵

- Se dividen en cepas invasivas y no invasivas en función por su capacidad para formar abscesos, la cepa invasiva tiene más actividad patógena (infección mixta) tanto in vitro como in vivo.⁴⁶

Su manejo se hace posible gracias a la utilización de antisépticos previa a la remoción mecánica del biofilm supra gingival o infra gingival, gracias a que presenta susceptibilidad a varios fármacos.^{46,47,48}

2.6. Definición de términos básicos

- **Extracto Hidroalcohólico:** Constituyente líquido, concentrado, obtenido de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como disolvente alcohol y agua. Presenta sedimento, color y aroma característicos de la planta de la cual se obtienen.⁴⁸
- **Halo de inhibición:** Zona al contorno de un disco embebido de extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde), en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen⁴⁹ e incubada a 35°C después de 24 horas, según **CLSI** (*Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*)⁵⁰.
- **Concentración mínima inhibitoria:** Es la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/ mL) que impide el desarrollo evidente de un microorganismo luego de un día de incubación a 37°C.⁵⁰

- **Eficacia antibacteriana:** Facultad de una sustancia para aminorar o arrasar, bacterias o colonias de éstas, evadiendo la enfermedad y la resistencia de cepas de microorganismo Gram positivas y Gram negativas concediéndoles la densidad mínima inhibitoria expuestas a fármacos bacteriostáticos como flavononas y flavonoles, se mide mediante de la dimensión (milímetros) de los halos de inhibición.⁵⁰

CAPÍTULO III: MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación

3.1.1. **Por su finalidad:** Básica

3.1.2. **Por su grado de profundidad:** Explicativa

3.1.3. **Por el método de contrastación:** Experimental – Propiamente dicho.

3.2. Operacionalización de variables:

VARIABLES	INDICADOR	VALORES	ESCALA
Variable Independiente Extracto Hidroalcohólico de las hojas de <i>Camellia sinensis</i> (Té verde)	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Camellia sinensis</i> (Té verde)	6, 25%,	Nominal
		12.5%	
		25%	
		50%	
		100%	
Variable dependiente Inhibición bacteriana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277).	Medida del diámetro de halo de inhibición	Nula (-): para un diámetro inferior a 6 mm.*	Intervalo
		Sensibilidad límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 7 a 14 mm.*	
		Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 15 y 19 mm.*	
		Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.*	

* Escala de Duraffourd

3.2.1. Población: Conformado por las colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

3.2.2. Criterios de selección del grupo de estudio

a) Criterios de inclusión:

- Cepa certificada de *Porphyromonas* y especie *gingivalis* (ATCC 33277).
- Hojas de *Camellia sinensis* (té verde) secas.
- Placas Petri con colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) sin contaminación.

b) Criterios de exclusión:

- Placas Petri con colonias que hayan contaminado el cultivo de estudio.
- Hojas de *Camellia sinensis* (té verde) que hayan sido expuestas a pesticidas o a plagas.
- Otro tipo de medio de cultivo.

3.2.3. Tipos de unidades de la población

3.2.3.1. Unidad de estudio

Placas Petri con agar Schaedler con colonias de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

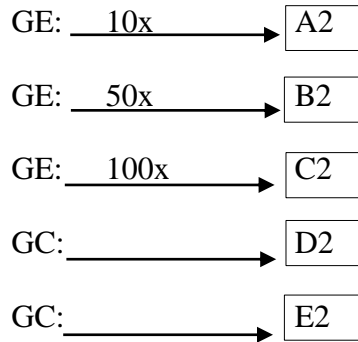
3.2.3.2. Unidad de muestreo

Placas con *agar Schaedler* con colonias de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

3.2.3.3. Unidad de observación

Cada una de las Placas Petri *con agar Schaedler* con colonias de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

3.3. Diseño de contrastación de la hipótesis: Diseño con estímulo creciente – post prueba.



3.4. Técnicas de recolección de datos

Se hizo uso del recuento de colonias a través de la observación, utilizando una hoja de registro como instrumento de recolección de datos.

3.5. Instrumento de recolección de datos

Hoja de registro:

- Hoja de Registro donde se anotaron las medidas de *los halos de inhibición* del *extracto hidroalcohólico de Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones del 6.25%, 12.5%, 50% y 100% (ANEXO 1).
- Hoja de Registro donde se anotaron las medidas de *los halos de inhibición* del *extracto hidroalcohólico de Camellia sinensis* (té verde) a concentraciones del 6.25%, 12.5%, 50% y 100%, de la clorhexidina al 0.12% y del alcohol de 70° (ANEXO 2).

3.6. Técnica de análisis de datos

Los resultados fueron sometidos a pruebas estadísticas de Normalidad (Shapiro-Wilk), de acuerdo a los resultados y considerando que las variables tienen valores constantes, no permite realizar cálculos estadísticos de prueba como ANOVA.

Los resultados se presentaron en tablas simples de contingencia y en un gráfico.

3.7. Consideraciones éticas

La investigación se llevó a cabo a través del uso de la especie vegetal *Camellia sinensis* (té verde) teniendo en cuenta el cuidado y preservación de la biodiversidad. Así mismo se usó la cepa estandarizada de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), obtenida del laboratorio GenLab, Lima, Perú. No se involucró a sujetos humanos o animales, razón por la cual no requirió de consideraciones que garanticen sus derechos.

3.8 Proceso

Sitio de investigación

El procedimiento experimental de todo el trabajo de investigación se ejecutó en el *Laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas S.R.L.* (InvBiomed S.R.L) Cajamarca -Perú.

Obtención y preparación de la muestra vegetal

- Las hojas de *Camellia sinensis* (Té verde) fueron adquiridas en la localidad de Cajamarca, en la Granja Orgánica el Paraíso; Fundo la Argentina.
- La recolección de la muestra se realizó en la Granja Orgánica el Paraíso; actual Fundo la Argentina, Prolongación 5 Esquinas, Cajamarca, (2,750 msnm.) provincia y departamento de Cajamarca.
- Se seleccionó 20 mg para la muestra de *Camellia sinensis* “té verde”, con hojas totalmente secas y sin tallos.
- Ya previamente seleccionados con la muestra completa se vierte el contenido en un molino de cuchilla (que se utilizó en 3 tiempos), el cual pulverizó las hojas secas transformando su consistencia.⁵²
- Con esta consistencia se procedió al tamizado; el cual consiste en separar dos sólidos formados por partículas de tamaños diferentes, con la finalidad de incrementar la superficie de contacto de los fitoconstituyentes, con el tamizador N°20, sobre papel Kraft.⁵³

Obtención del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde).

- Para el 100% se pesarán 20 gramos de *Camellia sinensis* pulverizados y tamizados, en una balanza calibrada.
- El contenido vegetal se acondicionó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, posteriormente se agrega 100 ml de alcohol de 90°, que tuvo que acondicionar, luego se vertió en contenido de la probeta en el matraz

que ya contenía la muestra vegetal, se selló y se introdujo el magneto, se forró con papel aluminio, para evitar fotosensibilidad y, se dejó en vibración constante durante 24 horas en un agitador magnético, a una temperatura ambiente.^{55, 56}

- Transcurrida las 24 h, luego se procedió a destilar con un embudo de cristal y gasa estéril.
- El sobrante del extracto obtenido se traslada a condensarse en el equipo de Rotavapor a presión y temperatura baja hasta haber quitado el alcohol contenido en la muestra.
- Posteriormente el extracto se colocó en un frasco ámbar y se enrosca para luego ser envuelto en papel aluminio, previamente ya rotulado.
- Finalmente, el extracto hidroalcohólico está preparado para las diluciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%.

Procedimiento para determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*:

a) Preparación del caldo BHI (Brain Heart Infusion).⁵⁰

- Se pesó 2,8 g, se diluyó en 200 mL de agua desionizada y se midió el pH.
- Se vertió los 2.8 mL en probetas de 15 x 100 mm.
- Se procedió a esterilizar a 121°C, 15 libras de presión, por 15 minutos y luego se dejó enfriar.

b) Preparación del agar Schaedler enriquecido con sangre de cordero.

- Se pesó 7.8 g de agar Müller – Hinton, marca Merck, se depositó en frasco de vidrio de 500 mL, luego se agregó agua destilada 200 mL, se tapó el frasco con tapa rosca y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea y se midió el pH.
- Rápidamente después de esterilizar (121°C, 15 libras de presión, por 15 minutos) se dejó enfriar en un baño de agua a 45 - 50° C.
- Se añadió sangre de cordero con anticoagulante estéril en una cantidad de 5% + 0,1mL de vitamina K1.
- Se echó el preparado fresco y tibio a una placa Petri de vidrio, de fondo plano y superficie horizontal para lograr un fondo uniforme de 4 mm, esto corresponde a 20 - 25 mL para placas Petri de 100 mm de diámetro.
- El agar se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Una muestra simbólica de cada porción de placas se analizó para verificar su esterilidad mediante incubación a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. o más.

c) Cepa bacteriana para el estudio

- Se realizó el estudio con una cepa bacteriana estándar de colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) obtenida del laboratorio GenLab, Lima, Perú.

d) Reactivación de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATC 33277).

- Se sacó el empaque de la cajita que contiene el microorganismo
- Se apretó (una sola vez) la ampolla en la parte superior del tubo que contiene *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) liofilizado (justo por debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- Se rehidrató la cepa liofilizada, partiendo la ampolla que contenía el tubo original de goma.
- Se sujetó en posición vertical y se golpeó sobre una superficie dura para permitir el flujo del líquido por medio del eje hacia la parte superior de la unidad que contiene el sedimento con *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), luego se dejó que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo hacia la parte interior de la unidad que contiene el sedimento.
- Se apretó en la parte inferior de la unidad y se trituró el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento se homogenice.
- Posteriormente se sembró mediante técnica de estrías en placa de Petri con agar Schaedler enriquecido con sangre de cordero defibrinada (5%) + vitamina K1, e incubado en una vasija de anaerobiosis a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, aproximadamente de 4 a 7 días.
- De 3 a 5 colonias fueron fijadas en Tubo conteniendo Caldo BHI, después se observó el crecimiento bacteriano en el tubo conteniendo caldo BHI. Se incubó a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 4 días.

e) Creación del ambiente anaerobio.

- Se procedió a adicionar uniformemente 30 mL de agua neutra sobre una placa de **Anaerocult A** de Merck, rápidamente enseguida se ubicó en el interior de una jarra de anaerobiosis, se selló herméticamente y luego de 30 minutos se consiguió un ambiente anaerobio al interior de la jarra.⁵⁰

Susceptibilidad *in vitro* a antibacterianos para el extracto hidroalcohólico.

1) Método: test de disco difusión en agar

El método Kirby Bauer es el más recomendado por el **CLSI** (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria) ⁴⁸⁻⁵⁰ para determinar la sensibilidad bacteriana a los antibacterianos.

a) Estandarización del inóculo

- Se empleó el método de suspensión directa de colonias y el estándar 0,5 de Mc Farland.
- Se usó de 3 a 5 colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) del cultivo reciente ejecutado de 24 horas y se detuvo en 4mL de caldo BHI, posteriormente se incubó entre 2 a 4 horas, logrando una turbidez final de 0,5 de la escala de Mc Farland.

b) Diseño experimental: (10 repeticiones)

Grupo experimental:

- Grupo Problema: Las diferentes diluciones del extracto *hidroalcohólico* de “Té Verde” (6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100%).
- Grupo Control Positivo: *Gluconato de clorhexidina al 0,12%*.
- Grupo Control Negativo: alcohol etílico al 96° (Diluyente)

Control microbiológico:

- Control de Esterilidad: Placa con medio de cultivo para control de esterilidad.
- Control de crecimiento Bacteriano: Placa con medio de cultivo con siembra de cepa patrón.

c) Impregnación de los discos:

- Se agregó 20 μL de estas concentraciones, a discos de papel de filtro Whatman N°3 (Oxford) de 6 mm de diámetro⁵³, con la ayuda de un micro catalíquidos (marca Boeco) dejándolos de 5 a 10 minutos hasta su completa absorción.

d) Evaluación del efecto inhibitorio - Difusión en agar (ANEXO 3)

- En un intervalo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) anteriormente estandarizado, se comenzó a sumergir en ella un hisopo de dacrón estéril girada muchas veces y presionada contra la pared interna del tubo sobre el

nivel del líquido, moviendo de esta manera el exceso de inóculo.

- Se sembró la superficie de las Placas Petri conteniendo agar Schaedler enriquecido (de 4mm de grosor) por rayado con el hisopo sobre toda la superficie en tres sentidos diversos girando la placa aproximadamente 60° cada vez para lograr un reparto constante del inóculo.

Finalmente se pasó sobre los márgenes del agar.

- Este procedimiento se realizó 10 repeticiones.
- Se colocó inmediatamente los discos previamente impregnados: 70 discos con 7 concentraciones diferentes (100%; 50%, 25%, 12.5% y 6.25%) del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “té verde”, en 01 disco conteniendo Gluconato de clorhexidina 0,12% (control positivo) y otro conteniendo alcohol etílico 96° (control negativo), distribuidos paralelamente sobre el agar.
- Cada uno de los discos fueron oprimidos levemente para lograr contacto con la superficie del agar.
- Control microbiológico: El control de Esterilidad, se incubó una placa con medio de cultivo para control de esterilidad.
- Control de crecimiento Bacteriano: Placa con medio de cultivo con siembra de cepa patrón.

- Las placas se ubicaron en posición invertida en la jarra de anaerobiosis (marca oxo e incubadas a 35°C) aproximadamente de 4 a 7 días.

e) Lectura e Interpretación:

- Finalizada la incubación se realizó la medición de cada halo inhibitorio adecuado a cada disco de papel de filtro Whatman N°3 (Oxford) de las distintas diluciones, penetrando por el centro del disco, con el apoyo del calibrador vernier. Los datos fueron anotados en el formato correspondiente (ANEXO 1).
- Se determinó el diámetro de inhibición conseguido a través de **Escala de Duraffourd:**⁵¹
 - **Nula (-):** para un diámetro inferior a 6 mm.
 - **Sensibilidad límite (sensible = +):** para un diámetro comprendido entre 7 a 14 mm.
 - **Medio (muy sensible = ++):** para un diámetro entre 15 y 19 mm.
 - **Sumamente sensible (+++):** para un diámetro superior a 20 mm.
- Las medidas de los halos de inhibición fueron comparadas con los halos que se formaron con el gluconato de clorhexidina 0.12% para cotejar resistencia o susceptibilidad.

2) Método: test de concentración mínima inhibitoria (CMI):

(ANEXO 2)

a) Método: Test de dilución en medio líquido

Según documento M11 del CLSI (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria)⁵⁰ que describe los estándares típicos para examinar anaerobios se utilizó procedimientos de CIM de macrodilución en caldo.

b) Preparación del inóculo: Cultivo puro.

- Para su preparación se tomó de 3 a 5 colonias de *Porphyromonas gingivalis* del cultivo puro reciente en 6mL de caldo BHI, luego se incubó entre 2 a 5 horas, logrando una turbidez final de 0,5 de la escala de Mc Farland.

c) Evaluación de la actividad antibacteriana:

- Se preparó 7 tubos de ensayo (13 x 100 mm) estériles.
- Los 5 tubos primeros (tubo N°1, al Tubo N°5) se le añadió 800 μL de cultivo puro de *Porphyromonas gingivalis*.
- Al N° 6 se le adicionó 1000 μL de cultivo puro de *Porphyromonas gingivalis*.
- Al N° 7 se le echó 1000 μL de caldo BHI estéril.

d) Diseño experimental:

- Grupo Problema:

- **Tubo N° 1:** se le adicionó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “Té Verde” al 6.25%.
- **Tubo N° 2:** se le añadió 200 μL de Extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “Té Verde” al 12.5%.
- **Tubo N° 3:** se le agregó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “Té Verde” al 25%.
- **Tubo N° 4:** se le agregó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “Té Verde” al 50%.
- **Tubo N° 5:** se le agregó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “Té Verde” al 100%.
- **Control Positivo: Tubo N° 6,** se le aumentó 200 μL de gluconato de clorhexidina 0,12%.
- **Control de crecimiento bacteriano: Tubo N° 7,** se le adicionó 200 μL de alcohol etílico 96° (control negativo).
- **Control de esterilidad: Tubo N° 8,** no se le agregó nada más que 1000 μL el cultivo puro.
- Se realizaron 10 repeticiones.
- Se incubó aproximadamente de 4 a 7 días en anaerobiosis (jarra de anaerobiosis) e incubadas (en incubadoras Memmert) a 35°C.

e) **Lectura e interpretación**

- Al finalizar el periodo de incubación, se procedió a hacer la lectura, en donde se observó el crecimiento bacteriano en cada una de las pipetas y se logró determinar la concentración mínima del extracto hidroalcohólico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.
- El caldo turbio indicaba el crecimiento bacteriano y el caldo claro la ausencia de crecimiento bacteriano.
- Consecutivamente a dicho procedimiento se realizó el conteo de las colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) de cada placa Petri, y los datos del monitoreo se anotaron en la hoja de registro, para su posterior interpretación estadística.

Método de Difusión de Agar en Discos:

1) Método de los discos de sensibilidad o de Kirby Bauer

El antibiograma se realiza según el método de **Kirby Bauer** es un método sugerido por el **CLSI** (*Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*)⁴⁸⁻⁵⁰ para precisar la sensibilidad bacteriana a los antibacterianos.

- Se colocaron 20 µl de las diluciones al 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100 % del *extracto hidroalcohólico* de “té verde” sobre los discos de sensibilidad para examinar el efecto antibacteriano.

- Los discos empapados con las diluciones del extracto alcohólico de las vainas de la especie vegetal *Camellia sinensis* “té verde”, se colocaron encima de la superficie de las placas cultivadas con el inóculo bacteriano.
- Con la asistencia de una pinza estéril ajustando débilmente sobre cada disco para lograr una fricción completa con la superficie del agar.
- Los discos uniformemente, se distribuirán de modo que se ubiquen a una separación de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 6 mm, para erradicar las superposiciones de los lugares de inhibición, posteriormente se procederá a incubar las placas en posición invertida a 35°C en un día.⁵¹

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) a diferentes concentraciones mediante el método de disco difusión en agar, sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 23377).

Los resultados al evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (Té verde) sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 23377), en concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25 % se ejecutó mediante el test de disco difusión en agar, ejecutando 10 repeticiones (n=10).

Se determinó que, la medición de los halos de inhibición de 11.7mm para la concentración de 25%, 15.2 mm para el 50% y 17.8 mm para una concentración del 100% (tabla 1), muestra que el extracto hidroalcohólico presenta sensibilidad limite sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 23377) en concentraciones de 25%, 50% y 100%; es decir posee efecto antibacteriano. (Tabla 2)

Es importante resaltar la inactividad de las concentraciones de 6.25% y 12,5%, por lo cual se descarta efectividad antibacteriana.

Tabla 1: Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones de 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100%, en milímetros.

REPETICIONES	Extracto Hidroalcohólico de té verde-concentraciones					Gluconato de clorhexidina al 0.12%
	6.25%	12.5%	25%	50%	100%	
Placa Petri 1	6	8.8	10.2	15.3	17.5	16.7
Placa Petri 2	6	8.6	12.9	16.2	17.8	16.1
Placa Petri 3	6	8.6	11	14.7	19	19.3
Placa Petri 4	6	8.5	10.07	14.3	17.6	18.7
Placa Petri 5	8	9	12	15.8	17.2	17.9
Placa Petri 6	6	9.4	12.1	14.7	17.8	15.3
Placa Petri 7	6	9.8	11.5	16.2	19.2	19.4
Placa Petri 8	6	9.5	11.2	14.9	17.4	17.5
Placa Petri 9	6	9.8	12.9	15.7	17.5	19.6
Placa Petri 10	6	8	12.2	14.5	17.2	17.00
PROMEDIO	6.2mm	9.0 mm	11.7 mm	15.2mm	17.8mm	17.8mm

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora. **Nota:** 6 mm es la medida del diámetro del disco (papel filtro) utilizado según CLSI⁽⁴⁸⁾

Tras el análisis se determinó que en las concentraciones más altas según la escala de Duraffourd, fue media mientras que para las concentraciones más bajas fue nula.

TABLA 2: CONCENTRACIONES CAMELLIA SINENSIS (TÉ VERDE)	PROMEDIO DE ESCALA DURAFFOURD
100%	17.82 mm → Medio
50%	15.2mm → Medio
25%	11.7mm → Sensibilidad límite
12. 5%	9.0mm → Sensibilidad límite
6. 25%	6.2mm → Nula
Gluconato de Clorhexidina 0.12%	18 mm → Medio

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora

4.2. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) del extracto mediante concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC23377).

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 23377) se utilizó el método de macro dilución en caldo, obteniendo como resultado que hay efectividad antibacteriana en las concentraciones más altas 100% y 50%, pero la concentración mínima fue 25% (125mg/ml) a esta concentración del extracto hidroalcohólico es capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 23377). (Tabla 3.)

Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

	GRUPO EXPERIMENTAL	NIVEL DE TURBIDEZ		CRECIMIENTO BACTERIANO
		Lectura		
Problema	Tubo N° 1: Extracto hidroalcohólico de té verde al 6.25%	+ ++	+++	++
	Tubo N° 2: Extracto hidroalcohólico de té verde al 12.5%	+/- +/- +/-	- +/- -	- + -
	Tubo N° 3: Extracto hidroalcohólico de té verde al 25%	- - -	- - -	- -
	Tubo N° 4: Extracto hidroalcohólico de té verde al 50%	- - -	- - -	- -
	Tubo N° 5: Extracto hidroalcohólico de té verde al 100%	- - -	- - -	- -
Control	Tubo N° 6: Gluconato de clorhexidina 0,12%. (Control Positivo)	- - -	- - -	- -
	Tubo N° 7: Alcohol etílico 70° (control negativo)	+ ++	+++	++
	Tubo N° 8: Cultivo – CEPA (Control de crecimiento bacteriano)	+ ++	+++	++
	Tubo N° 9: Caldo BHI estéril. (Control de esterilidad)	- - -	- - -	- -

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora.

Leyenda: (+) indica que hay turbidez

(-) indica que no hay turbidez

4.3. Comparación del efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) según método de disco difusión en agar y CIM y el gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Comparando el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico del té verde en concentraciones de 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 100% y el gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), mediante el test de disco difusión en agar se evidenció que el gluconato de clorhexidina al 0,12% presenta medida de halos de inhibición de 17.8 mm en promedio; el halo de inhibición cercano al obtenido por el extracto hidroalcohólico cuyo máximo halo de inhibición es de 17.8mm para la concentración del 100%; así mismo el extracto hidroalcohólico evidenció halos de inhibición de mm en promedio (n=10) para cada una de las concentraciones evaluadas (25% 50%). Tabla 3

Tabla 4: Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones de 6.25%,12.5%,25%, 50% y 100% en milímetros y CIM.

Grupos de estudio	Media de los halos de inhibición (n=10)	
Extracto hidroalcohólico de té verde (milímetros)	100%	17.8 mm
	50%	15.2 mm
	25%	11.7 mm
	12.5%	9.0 mm
	6.25%	6.2 mm
Extracto hidroalcohólico de té verde (CIM)	100%	- (100 %)
	50%	- (100 %)
	25%	- (80 %)
	12.5%	+ (100 %)
	6.25%	+ (100 %)
Gluconato de clorhexidina 0.12%	17.8 mm	
Alcohol 70°	6 mm	

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora.

Nota: 6 mm es la medida del diámetro del disco utilizado según CLSI⁽⁴⁸⁾

Los resultados anteriormente redactados en las tablas anteriores se resumen en el siguiente gráfico.

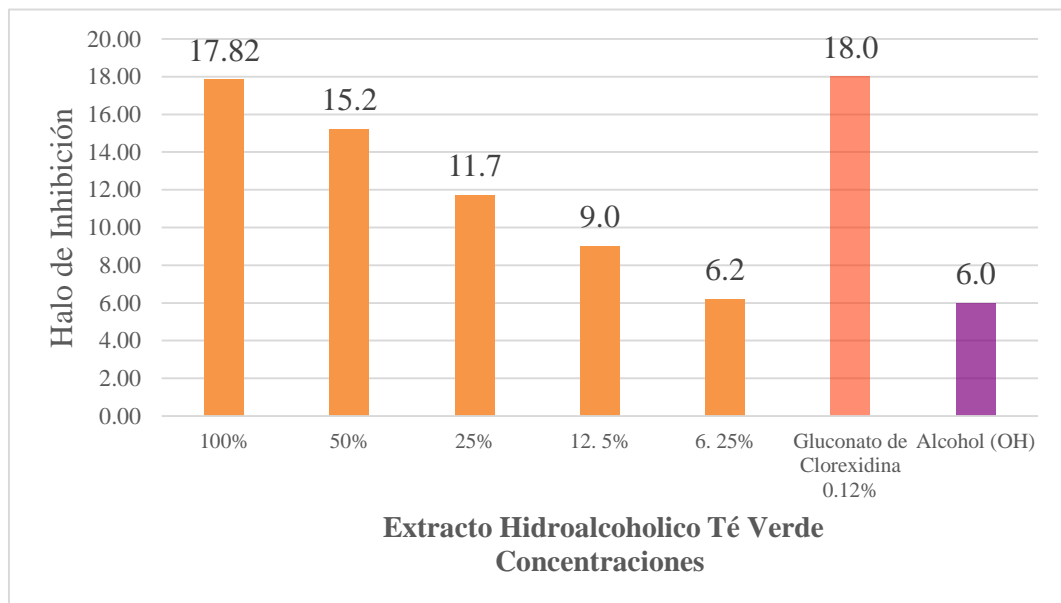


GRÁFICO 1: Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (Té verde) en concentraciones de 100%, 50%, 25% ,12.5% y 6.25%, gluconato de clorhexidina al 0.12% (control positivo) y alcohol de 70° (control negativo).

Así mismo, los resultados fueron analizados estadísticamente, mediante el Test de Shapiro Wilk. El Test de Shapiro Wilk resolvió que existe diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la medida de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) en sus diferentes concentraciones y el gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). Siendo el gluconato de clorhexidina superior a el extracto hidroalcohólico.

(ANEXO 5- Tablas 4 y 5).

De acuerdo a este resultado y considerando que las variables resultantes tienen valores constantes de acuerdo a la escala de Duraffourd, esto no permite realizar cálculos estadísticos de prueba como ANOVA. (ANEXO 5- Tabla 2)

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Con el propósito de evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) procedente de la Granja Orgánica El Paraíso ubicado en el fundo “La Argentina”, distrito, provincia y departamento de Cajamarca, sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) se realizó el presente estudio obteniendo los resultados presentados anteriormente, los cuales analizaremos a continuación.

El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) presenta efecto antibacteriano límite en concentraciones de 6.25% y 12.5% mediante el test de disco-difusión y en concentración mínima inhibitoria (CMI) es del 25% (125mg/mL) sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Autores como Funosas *et al*⁽⁹⁾, Jiménez⁽¹⁰⁾, Okamoto *et al*⁽¹¹⁾, García⁽¹²⁾, Nakata⁽¹⁴⁾, Sandoval⁽¹³⁾, Moromi *et al*⁽¹⁵⁾ y Paredes⁽¹⁶⁾ han demostrado que la *Camellia sinensis* (té verde) presenta inhibición bacteriana significativa sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis*^(9, 12, 16), *Streptococcus spp*⁽⁹⁾ que incluyen al *Streptococcus cariogénicos*, *Pseudomonas*^(9, 10).

Al determinar el efecto antibacteriano del extracto en concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% frente a las colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), los resultados obtenidos fueron los esperados mostrando sensibilidad media, con halos de 17.82 mm en promedio para las concentraciones de 100% y 50%, (Tabla 1)

resultados muy cercanos a los obtenidos en investigaciones previas por Moromi⁽¹⁵⁾ y Paredes⁽¹⁶⁾ quienes también usaron extractos de té verde en concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% frente a cepas de flora salival mixta, donde presentó actividad *in vivo*, mientras que *in vitro* el gel al 1% y 2%, que fueron aplicados clínicamente, donde hubo solo efectividad solo en el sitio de contacto, esto se debe a la poca difusión en dicho medio este ensayo es difícil de contrarrestar dado que el presente trabajo no es similar.

Sandoval⁽¹³⁾, al investigar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de té verde en concentraciones de 6.25% y 12.5% frente a microorganismo de importancia periodontal obtuvieron medidas de halos de inhibición 16 mm, cercanos a los halos del gluconato de clorhexidina 0.12%; considerándose halos de sensibilidad media; mientras que en este estudio de extracto hidroalcohólico en esas concentraciones tuvo halos de inhibición 6 mm que según la escala de Duraffourd se clasifica como nula.

Nakata⁽¹⁴⁾, en su estudio usó la concentración al 10% de extracto té verde frente a cepas de *Streptococcus mutans*, donde posee efectividad antibacteriana con halos de entre 6 a 20 mm, no se puede contrarrestar con nuestro estudio ya que esta concentración no fue utilizada para la cepa de investigación.

Según el método de macrodilución usado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se observó que el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) con concentraciones al 100%, 50% y 25% tuvieron la suficiente capacidad para inhibir el crecimiento de cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), mientras que las concentraciones del 12.5% y 6.25% del extracto hidroalcohólico

de *Camellia sinensis* (té verde) no presento una significativa inhibición bacteriana en cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). (Tabla 3), para la Concentración Mínima Inhibitoria coincidimos con Moromi¹⁴ que fue del 25%, pero en su investigación no presento efectividad, mientras que para este estudio demostró la acción antibacteriana.

Al comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) a diferentes concentraciones tuvieron la suficiente capacidad para inhibir el crecimiento de cepas de *Porphyromonas gingivalis* y comparándolo con el efecto antibacteriano del gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) los resultados muestran que el extracto hidroalcohólico, es lo suficiente para acercarse al gluconato de clorhexidina al 0,12% , ya que inhibe el crecimiento de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* (Tabla 4); los datos confirman que el uso del gluconato de clorhexidina al 0,12% sigue siendo el Gold estándar para tratar afecciones de la cavidad oral causada por diversos Microorganismos aerobios y anaerobios.^(12- 59)

Muchos de los estudios mencionados anteriormente no se pueden contrastar ya que la mayoría han sido estudios *in vivo*.

Para finalizar coincido con los autores como Funosas *et al*⁽⁹⁾, Okamoto *et al*⁽¹¹⁾, García ⁽¹²⁾, Sandoval⁽¹⁴⁾, Moromi *et al* ⁽¹⁵⁾ y Paredes ⁽¹⁶⁾en que *Camellia sinensis* presenta efectividad antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*, lo cual hace validar nuestra hipótesis.

Los resultados obtenidos en esta investigación siguen el mismo orden en que fueron recogidos y como se muestran en el diseño de la metodología.

Por más filtración hecha igual quedó sedimento que se situaba en el fondo del recipiente, sin embargo, no hubo forma de solucionar dicho problema ya que según las palabras del Dra. Miriam Gómez “la única manera de filtrar en su totalidad el producto haría que éste perdiera propiedades e inclusive podría hacerlo inservible.” Así mismo es importante resaltar que el proceso para obtener el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) ha sido supervisado permanentemente por un profesional Químico Farmacéutico certificado de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.

Podemos decir que las hojas de *Camellia sinensis* (Té verde) son conocidas, básicamente por las presentaciones en las que lo encontramos son procesadas en bolsitas para hacer “té”, y en cápsulas, por la recomendación de la Dra. Jéssica Bardales, Licenciada en Farmacia y Bioquímica fue de utilizar para la fabricación del extracto hidroalcohólico, hojas frescas de té verde, lo cual fue difícil de conseguir, pero no imposible, debido a que no hay plantaciones de té verde, ya que es bastante delicado el sembradío del mismo, por lo que se utilizó hojas de té verde secas del fundo La Argentina, Granja Orgánica: El Paraíso; lo cual dificultó mínimamente la elaboración del extracto hidroalcohólico.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), en concentraciones al 100% y 50% según el método de disco difusión y una concentración mínima inhibitoria (CMI) del 25%, según el método de macrodilución.
- El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones al 12.5% y 6.25% según el método de disco difusión, no presenta efecto antibacteriano; según el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) no presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).
- El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) a concentraciones 50% y 100% presentan efecto antibacteriano límite frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), acercándose al Gluconato de clorhexidina al 0.12%, frente a cepas *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

6.2. Recomendaciones

- Realizar estudios que utilicen otros métodos de extracción de los principios activos de la *Camellia sinensis* (té verde) con la finalidad de demostrar el efecto antibacteriano de esta planta frente a otros Microorganismos de importancia periodontal.
- Evaluar tratamientos preventivos de patologías infecciosas orales en base al empleo del extracto de *Camellia sinensis* (Té verde) que permitan minimizar costos y efectos.
- Es necesario estudios de acción de sinergismo de extracto té verde *in vitro* con posteriores estudios *in vivo* para demostrar su eficacia y aplicación futura en el campo de la salud bucal.
- Evaluar la posibilidad de aplicar los colutorios de *Camellia sinensis* como enjuagatorio en comunidades vulnerables, teniendo en cuenta su bajo costo y fácil preparación.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2013. 2005; 6(32):35-50 .
2. D. Ramos, H. Moromi, E. Martínez Cadillo. “*Porphyromonas gingivalis*: predominant pathogen in chronic periodontitis”. Laboratorio de microbiología Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Odontol. Sanmarquina 2011; 14(1): 34-38.
3. P. Del Río Martínez. “Actividad Biocida de un Propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio *in vitro*”. Área de Microbiología. Tesis, Universidad de Chile. 2006
4. N Dutzan, J Gamonal, A Silva, M Sanz, R Vernal. over-expression of forkhead box p3 and its association with receptor activator of nuclear factor ligand, interleukin (1)-17, 11-10 and transforming growth factor- during the progression of chronic periodontitis. j clin periodontol, 2009; 36: 396 -403.
5. A. Bascones Martínez, S. Mudarra Morante, E. Perea Pérez. “Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal.” av periodon implantol. 2002; 14,3: 101-114.
6. M. Mora Vargas. “Evaluación de la eficacia del curetaje cerrado en bolsas de 5, 6, 7 mm en piezas posteriores de pacientes tratados en la clínica de especialidades odontológicas ULACIT”. San José, C. R : ULACIT. J Díaz,

- J Yáñez, S Melgar, C Alvarez, C Rojas, R Vernal. (2012) “virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter*.”
7. Eduardo Lagos La Rosa, Perú (Tacna 2012). “Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis”. Para optar el Título de Químico Farmacéutico.
 8. Q Ardila, I Martha. “Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Universidad de Caldas. Colombia. 2009
 9. Funosas ER, Martínez AB, Pignolo M, Maestri L, Aromando RF, Scozzarro SM, Escovich L, Hermida PS. “Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica.” *av. odontoestomatol* 2005; 21-3:159-166.
 10. Jiménez Campos L. (agosto del 2008). “Uso del té verde como coadyuvante en el tratamiento de las bolsas periodontales en pacientes de la clínica de especialidades odontológicas ULACIT”. Tesis de licenciatura. Universidad latinoamericana de ciencia y tecnología. 2008.
 11. Okamoto M, Sugimoto A., Leung KP., Nakayama K., Kamaguchi A. y Maeda N “Inhibitory effect of green tea catechinson cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*”. *Oral microbiology and immunology* 2004; 19:118-120.

12. Garcia KR. “Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia sinensis* (té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva” [Doctor en ESTOMATOLOGÍA]. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO; 2015.
13. Sandoval Rivera, María Alejandra . Efecto inhibitorio del aceite esencial de romero vs té verde frente a *Porphyromonas gingivalis*. Estudio *in vitro*. [Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Odontólogo]. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR; 2018.
14. Nakata H.” Efecto antimicrobiano *in vitro* de *Camellia sinensis* sobre bacterias orales”. Odontología. Sanmarquina 2007; 10(1): 18-20.
15. Moromi H, Gutiérrez M, Ortiz L, Martínez K, Medina C, Ramos D, Ruiz J, Castro Y. “efectividad *in vitro* e *in vivo* de un gel a base de *Camellia sinensis* “té verde” frente a Microorganismo de importancia en procesos periodontales”. Odontol. sanmarquina 2011; 14(2): 10-12.
16. Paredes Sampen N. “Efectividad antibacteriana *in vitro* de una infusión a base de *Camellia sinensis* y *Mynthostachys mollis* sobre flora salival mixta”. (Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista) Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos; 2009.
17. Paola C. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral. [Internet]. 2016 [citado 26 Jun 2020];9(2):1-7. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072016000200016.
18. MINSA. Anexo N°2. Programa Presupuestal 0018. Programa Enfermedades No Transmisibles. Perú-Lima. 2019.

19. Duque A. Prevalencia de periodontitis crónica en Iberoamérica. *ELSEVIER*. 2016; volumen (9): 208-215.
20. Arteaga S, Dávila L, Gutiérrez R, et al. Efectividad Del Gel De Manzanilla Y Llantén Como Terapia Coadyuvante en el Tratamiento De La Periodontitis Crónica. *ACTA BIOCLÍNICA*. 2017; volumen 7 (13):1-20.
21. Ríos J. Avances en la microbiología en la Periodontitis [Tesis para optar grado de Cirujano Dentista]. Lima -Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2017.
22. Hurtado Camarena A y cols. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *ORAL*. 2016; 17 (54): 1374-1378.
23. Martínez A, Llerena M, Herera M, Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados. 2017; volumen 3 (1): 99-108.
24. Zerón A. “La nueva clasificación de enfermedades periodontales”. *Revista ADM*. 2018; 75 (3): 122-124.
25. Mayorga I, Lafaurie G, Contreras A, Castillo D, Baron A, Aya M. 2007 “microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico”. *biomédica.*; 27, 1: 21-33.
26. Sánchez E, Vargas M, Gutiérrez J. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología. Toxicidad hepática por té verde (*Camellia sinensis*). [Revisión de tema]. 28 (1) 2013.
27. López G. "Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y

- Streptococcus sanguis* (ATCC 10556)". [Tesis para optar grado de Cirujano Dentista]. Lima- Perú: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2014.
28. Cayo C. “Actividad Antibacteriana *In vitro* Del *Camellia sinensis* (Té Verde) Y Propóleo en comparación a la Clorhexidina Al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)”. [Doctor en Odontología]. Lima- Perú: Universidad Nacional Federico Villareal; 2019.
29. Arab H. y col. A Review of The therapeutic effects of *Camellia sinensis* (green tea) on oral and periodontal health. J. Med. Plants. Res. 2015; 5(23): 5465-9.
30. Fernández Sáenz K y García Lecca C. (2009), Tesis presentada “Efectividad antibacteriana *in vitro* de una solución a base de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* frente a flora salival mixta en pacientes ortodónticos” Lima-Perú 2009 Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
31. Isabel del Castillo. El té verde, un tesoro para la salud. Holística.net. [serie en internet]. 27/04/2010; Disponible en: http://www.holistika.net/nutricion/alimentos_especiales/el_te_verde_un_tesoro_para_la_salud.asp.
32. Rosas K. Analisis de los principios activos en *Calendula officinalis* y *Camellia sinensis* [Ingeniero farmacéutico]. Instituto Politécnico Nacional Unidas Profesional Interdisciplinada de Biotecnología; 2012.
33. Cunha D, Aparecida S, Assed L, Calvano E. “Eficacia antibacteriana de la epigallocatequina-3-galato contra el *Streptococcus mutans*”: una revisión sistemática. Univ Odontol. 2017 Ene-Jun; 36 (76). Disponible en: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo36-76.aees>

34. Salinero C, Barreiro R, Regueira N. Té, Catequinas Y Salud. MOL, 2018; 18: 47- 54.
35. Arguedas E., Río S, Alajuela C. (2008) procedimientos para hacer la infusión de té verde. Bioprocesos s.a..
36. Jiménez B., Melissa k. (2010). “Efecto Antimicrobiano *in vitro* de los Extractos Acuosa y Etanólica del *Eucalyptus globulos* (Eucalipto) en diferentes concentraciones sobre la cepa de *Lactobacillus spp*”. Tesis Para Obtener El Doctorado: Universidad Privada Antenor Orrego, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología.
37. Parra P. Análisis de Cadena Alimentaria. Dirección Nacional de Alimentos [Internet] 2005; [Citada 2020-Jun-30] Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/infusion/Te-mayo-2006/Infusiones_Te.htm
38. Vademécum Farmacológico Peruano. Clorhexidina, ediciones médicas internacionales, 2015 pág. 523.
39. B Vásquez C. Efecto de dos colutorios de clorhexidina al 0.12% sobre el pH salival en pacientes atendidos en el curso de periodoncia de la clínica docente asistencial odontológica. [Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista]. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote. Trujillo-Perú.2018.
40. Jara V. E. “Comparacion de Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial *Schinus molle* L. (Molle) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) con el Gluconato de Clorhexidina Al 0.12% Frente A *Porphyromonas gingivalis*. Estudio In

- vitro*” [Tesis para optar el grado de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2019
41. Salinas J. “Eficacia entre Clorhexidina al 0.12% y Borosan como coadyuvante para el tratamiento de la periodontitis crónica”. [Tesis Para Optar El Título Profesional De Cirujano Dentista]. Universidad De Guayaquil Facultad De Odontología; 2020
 42. Cuyan Milian, ME." Comparación entre el efecto del extracto hidroetanólico de semillas de *Caesalpinia spinosa* (tara), hipoclorito al 5,25% y gluconato de clorhexidina al 2% en la desinfección *in vitro* de conos de gutapercha contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212" [optar Título Profesional De Cirujano Dentista]. Universidad Señor de Sipán; 2019.
 43. Mileydi de la c. Torres López, Marcial Díaz Álvarez, Alina Acosta Morales. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. Revista estomatológica de México 2008.
 44. Fernández A, Guevara S, Henckell C. Antisépticos Orales: Clorhexidina, Flúor y Triclosán. Salud & Vida Sipanense. [Internet] 2020 [02-07-2020]; 6 (2): 4 o 14. Disponible en: <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/1209/1028>.
 45. Apaza D. “Estudio in vitro del efecto inhibitorio de un bioyogurt con cepas probióticas: *l. reuteri*, *l. rhamnosus*, *l. johnsonii*, sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*”. [obtener el Título Profesional de: Cirujano Dentista.]. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA; 2016.
 46. KY, Song KP y Chan KG (2016) *Porphyromonas gingivalis*: Una descripción general del patógeno periodontopático debajo de la línea de las encías. Frente. CMicrobiol 7:53.

47. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999; 20(1):14-52.
48. Flores C. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* "Taya" sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Tesis para optar el Grado De Bachiller En Estomatología]. Trujillo – Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
49. Díaz Zúñiga J1, Yáñez Figueroa J1, Melgar Rodríguez S1, Álvarez Rivas C1, Rojas Lagos C1, Vernal Astudillo R. “Virulencia y Variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis”. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 5(1); 40-45, 2012.
50. Nuñez W, Quispe R. Evaluación antioxidante y antienzimática *in vitro* y antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de la *Caesalpinia spinosa* “tara” [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor De San Marcos; 2015.
51. Centurión K. “Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668”. [Tesis para obtener el grado de maestro en estomatología]. Trujillo - Perú: Universidad Privada Antenor Orrego; 2015
52. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M11-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. 15 p

53. Flores C. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* taya sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Tesis para optar el grado de bachiller en estomatología]. Trujillo – Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
54. López L, Farmacéutica. El té verde, fitoterapia: 21(5);2015: 30-77
Disponibile en :<http://www.doymafarma.com>
55. Pimentel-Ramirez E, Castillo-Andamayo D, Quintana Del Solar M, Maurtua-Torres D, Villegas-Vílchez L, Díaz-Santisteban C. Rev Estomatol Herediana. Efecto antibacteriano de extractos etanólico de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre Microorganismo de la cavidad bucal .2015; 25(3):268-77.
56. Bonilla D.M, Mendoza Y., Moncada C.E, Murcia O, Rojas Á.P, Calle J, Pinzón, L. Nerio R., Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada *in vitro*, Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.2016;45(2):275-287.
57. Pumacajia y, “Efecto Antibacteriano de la Infusion De *Camellia sinensis* (Te verde) Sobre *Streptococcus mutans* en cepillos Dentales De Estudiantes De I.E.S. San Antonio De Padua, Puno -2015”. Puno, Perú Tesis Para Optar El Título de Cirujano Dentista.
58. Aguirre C, Huatuco JG, (2014) "Efectividad Antibacteriana de dos pastas medicamentosas frente al *Enterococcus faecalis*". Tesis Para Optar El Título de Cirujano Dentista]. Chiclayo, Perú.
59. Santos A. Efectividad antibacteriana del gluconato de clorhexidina al 0.12% y el hipoclorito de sodio al 2.5% como soluciones antisépticas del conducto

radicular [Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2003.

60. Mora Vargas, María De La Cruz (2005). Evaluación de la eficacia del curetaje cerrado en bolsas de 5, 6, 7 mm en piezas posteriores de pacientes tratados en La clínica de especialidades odontológicas ULACIT 2005. San José, C.R.: ULACIT.

ANEXOS

ANEXO 1: TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS

Diámetros de halos de inhibición de *Porphyromonas gingivalis*

(ATCC 33277) según diferentes concentraciones del extracto Hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “té verde”.

DISCO Concentración <i>Camellia sinensis</i>	Diámetros de halos de inhibición (mm)										Promedio (mm)
	Placa I	Placa II	Placa III	Placa IV	Placa V	Placa VI	Placa VII	Placa VIII	Placa IX	Placa X	
100%											
50%											
25%											
12.5%											
6.25%											
C+											
C-											
Cc											
Ce											

C+	Control Positivo: Gluconato de Clorhexidina 0,12%
C-	Control Negativo: Alcohol 96°
Cc	Control de crecimiento - cultivo puro
Ce	Control de esterilidad del medio

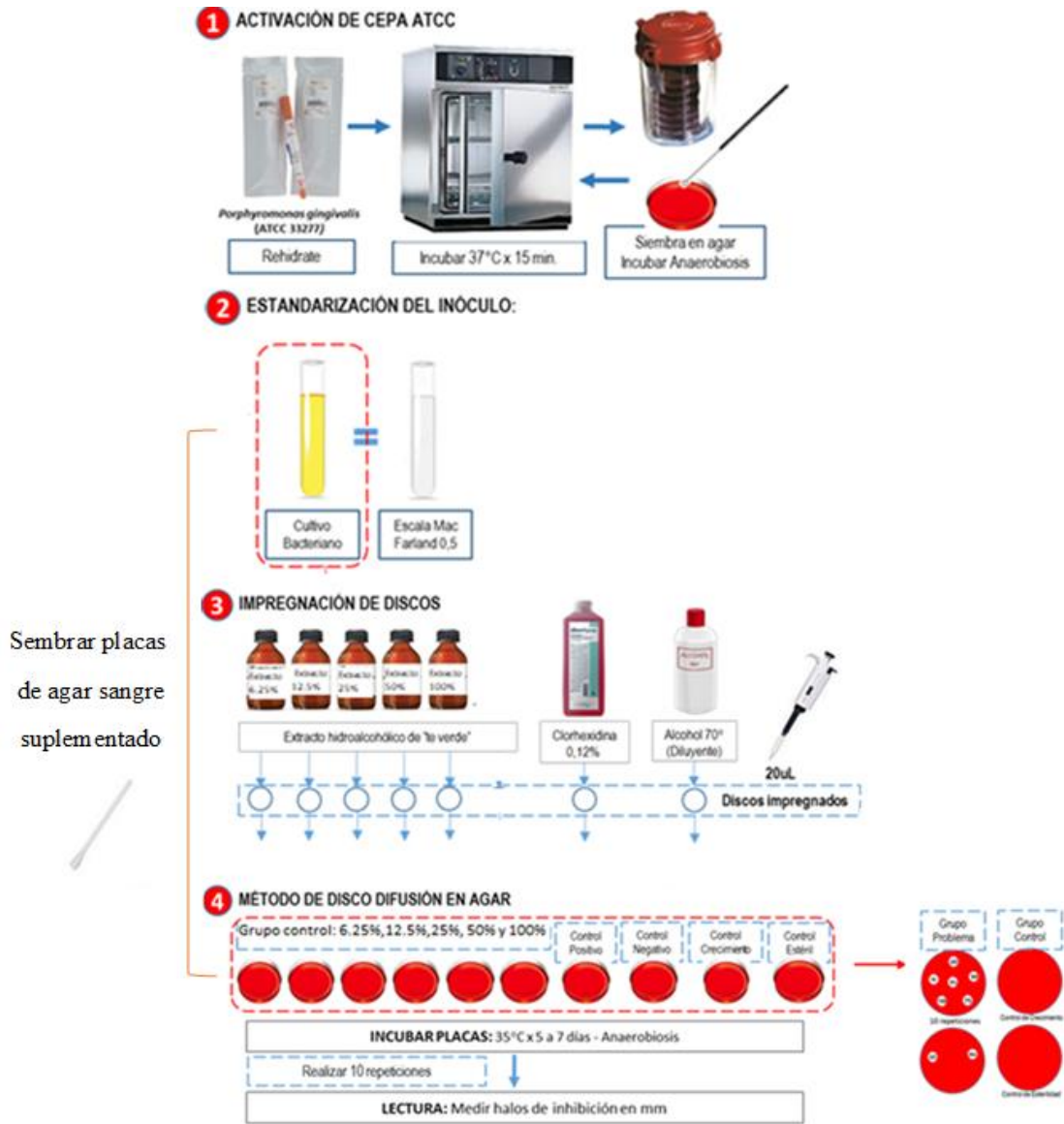
ANEXO 2: TEST DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Crecimiento bacteriano de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) según diferentes concentraciones extracto Hidroalcohólico de *Camellia sinensis* “té verde”.

GRUPO EXPERIMENTAL		NIVEL DE TURBIDEZ		CRECIMIENTO BACTERIANO
		lectura 24 h	lectura 48 h	
Problema	Tubo N° 1 Extr. hidroalcohólico de té verde al 3.12%			
	Tubo N° 2 Extr. hidroalcohólico de té verde al 6.25%			
	Tubo N° 3 Extr. hidroalcohólico de té verde al 12.5%			
	Tubo N° 4 Extr. hidroalcohólico de té verde al 25%			
	Tubo N° 5 Extr. hidroalcohólico de té verde al 50%			
	Tubo N° 6 Extr. hidroalcohólico de té verde al 100%			
Control	Tubo N° 7 Gluconato de clorhexidina 0,12%. (Control Positivo)			
	Tubo N° 8 Cultivo – CEPA (Control de crecimiento bacteriano)			
	Tubo N° 9 Caldo BHI estéril. (Control de esterilidad)			

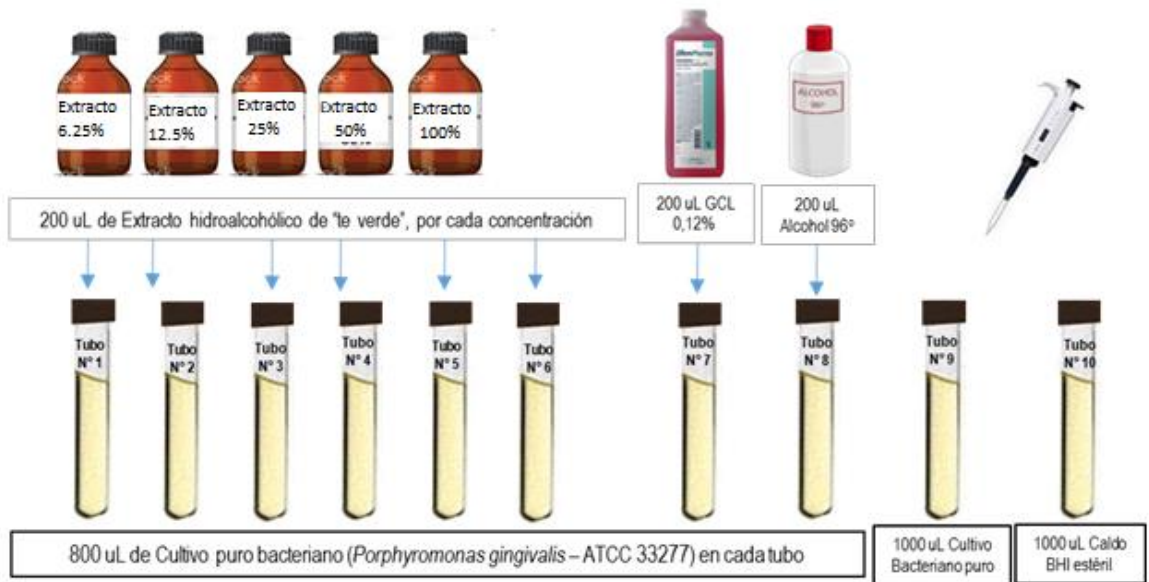
Leyenda: (+) indica que hay turbidez
(-) indica que no hay turbidez

ANEXO 3: PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO- DIFUSION DISCOS AGAR



**ANEXO 4: PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO- CONCENTRACIÓN
MINIMA INBIHITORIA**

5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)



ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 5: Prueba de Shapiro- Wilk de la media de los halos de inhibición del extracto acuoso de *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones al 100%, 50%, 25%,12.5%, 6.25% en comparación a la media de los halos de inhibición del gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277)

Concentraciones del extracto hidroalcohólico <i>Camellia sinensis</i> (té verde)	Halo de inhibición del ext. hidroalcohólico <i>Camellia sinensis</i> (té verde) en mm	Halo de inhibición del gluconato de clorhexidina al 0.12% en mm	Shapiro- Wilk	
	Promedio	Promedio	P-value	Decisión
100%	17.8 mm	17.8 mm	0.007	p<0.05
50%	15.2mm	17.8 mm	0.000	p<0.05
25%	11.7mm	17.8 mm	0.000	p<0.05
12.5%	9.0 mm	17.8 mm	0.000	p<0.05
6.25%	6.2mm	17.8 mm	0.000	p<0.05

Fuente: Elaborado por los investigadores

Existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los halos de inhibición extracto del hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde) en sus diferentes concentraciones y el gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277). Siendo el gluconato de clorhexidina superior al extracto hidroalcohólico ($\mu_1 < \mu_2$).

ANEXO 6: REGISTROS FOTOGRÁFICOS

Obtención y preparación de la muestra vegetal



Foto 1: Recolección de hojas secas de *Camellia sinensis* (Té Verde)



Foto 2: Pulverización de hojas de *Camellia sinensis* (Té Verde)



Foto 3: Tamizaje (Tamizador #20) de *Camellia sinensis* (Té Verde)

Obtención del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* (té verde)



Foto 4: Pesaje de 20 g de *Camellia sinensis* (Té Verde)



Foto 5: Acoplamiento de 100 ml de alcohol de 90° para preparar el extracto hidroalcohólico

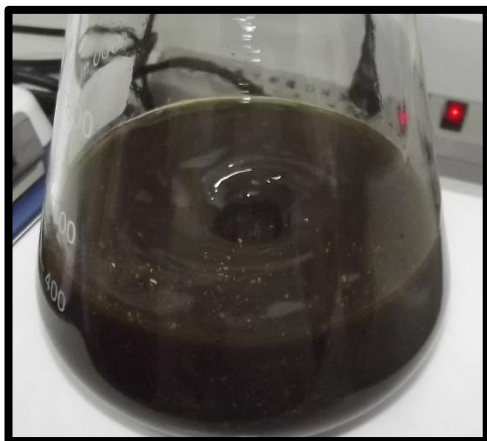


Foto 6: Colocación del imán en el contenido vegetal.

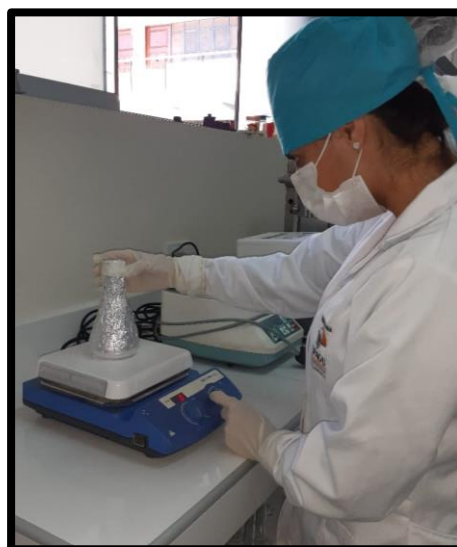


Foto 7: Forrado con papel aluminio y colocado en el agitador magnético x 24 h.



Foto 8: Filtrado del extracto hidroalcohólico con apósitos estériles.

Foto 9: La solución filtrada, se lleva al rotavapor, donde se extraerá el alcohol por 1h



Foto 10: La solución extraída, se lleva a un frasco ámbar.

Procedimiento para determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Preparación De Los Medios De Cultivo



Foto 11: Instrumentos para la preparación de Agar Schaedler

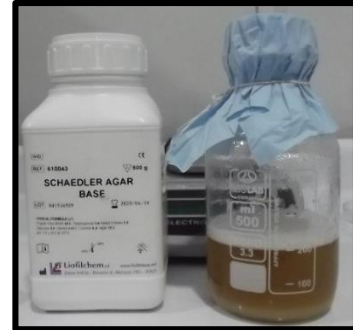


Foto 12: Agar Schaedler preparado.



Foto 13: Esterilización de agar para evitar el crecimiento de microorganismos ajenos a la investigación.

Reactivación de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).



Foto 14: Empaque de cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).



Foto 15: Incubación por 2h horas en ambiente de microaerofilia a 37°C



Foto 16: Enriquecimiento del agar con vitamina-K1, después de la esterilización.



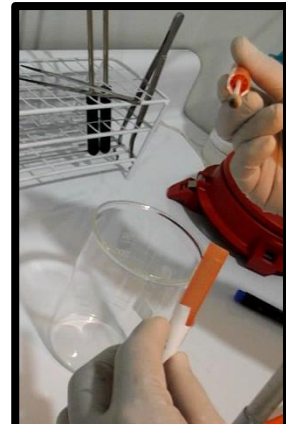
**Foto 17: Preparación
Agar enriquecido con
sangre de cordero**



**Foto 18: Distribución del Agar
Schaedler en Placas Petri**



**Foto 19: Sobre de “anaerobiosis” que
será utilizados para generar el
ambiente anaerobio**



**Foto 20: Pipeta con cepa
liofilizada**

Susceptibilidad *in vitro* a antibacterianos para el extracto hidroalcohólico.

Método: test de disco difusión en agar



**Foto 21: Inoculación de la
superficie de las Placas Petri
(10 repeticiones)**



**Foto 22: Control de esterilidad
y Control de crecimiento
bacteriano.**



Foto 23: Grupo problema: extracto hidroalcohólico al 100%, 50%, 25%.12.5% y 6.25%.



Foto 24: Impregnación de discos con 20 μ L de los preparados



Foto 25: Grupo Experimental y grupo control distribuidos equidistantes en la superficie del agar



Foto 26: Placas Petri con discos embebidos en las concentraciones porcentuales de té verde.



Foto 27: Placas Petri en la jarra con sobres de anaerobiosis



Foto 28: Incubación de Placas Petri a 36°C durante 4 días



Foto 29: Halos de inhibición, presentes en Placas Petri después de los 4 días.



Foto 29: Medición de cada halo inhibitorio con vernier

Método: Test de concentración mínima inhibitoria (CMI)

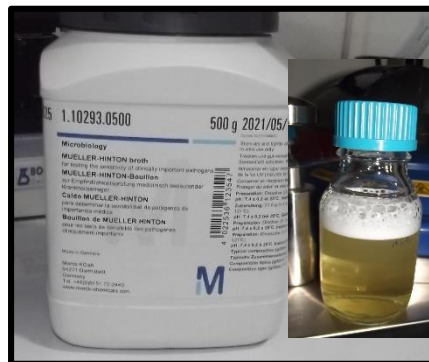


Foto 30: Agar M.H preparado.



Foto 31: Cultivo puro turbidez final de 0,5 de la escala de McFarland

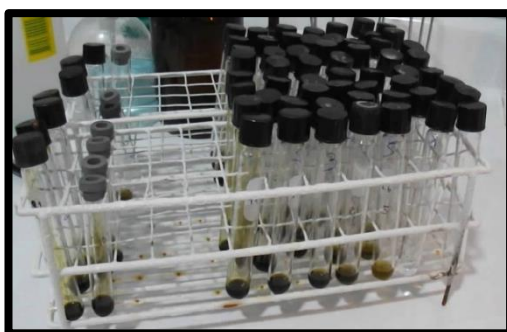


Foto 32: Extracto hidroalcohólico de té verde en concentraciones 100%, 50%, 25%.12.5% y 6.25% (grupo problema)



Foto 33: tubos de ensayos en la jarra con sobres de anaerobiosis



Foto 34: Incubación por 3 a 4 horas en ambiente de microaerofilia a 35°C

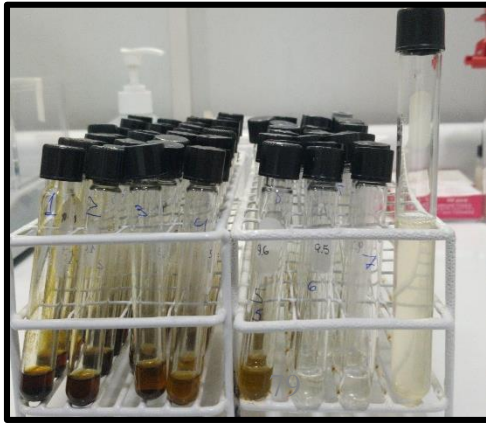


Foto 35: Lectura e interpretación