

Efecto antibacteriano del enjuague bucal de *Salvia officinalis* sobre *Streptococcus mutans*

Antibacterial effect of Salvia officinalis mouthwash on Streptococcus mutans

Nadia Stephany Orihuela-Mendoza,* Claudia Alicia Meléndez-Wong,** José Juan Torres-Martínez,***
Javier Ulises Hernández-Beltrán,*** Dora María López-Trujillo.****

RESUMEN

Introducción: el autocuidado oral para el control de la caries es esencial para su prevención. Una de las alternativas naturales empleadas para ello es la *Salvia officinalis* reconocida como antibacteriana, antifúngica y astringente; además, por su bajo costo representa una alternativa eficaz y accesible para gran parte de la población. **Objetivo:** evaluar la efectividad del enjuague de *Salvia officinalis* sobre la reducción de *Streptococcus mutans*. **Material y métodos:** el presente estudio es un diseño de investigación experimental, de nivel relacional con una planificación de toma de datos prospectiva, transversal y analítica. Se utilizó una cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y enjuague de *Salvia officinalis* al 5, 10 y 100%. El extracto se obtuvo por extracción etanoica para posteriormente pasar a una fase evaporativa. Se empleó clorhexidina al 0.12% como control positivo y agua destilada como control negativo. Para la prueba de hipótesis se aplicaron las pruebas de ANOVA, y la de comparaciones múltiples de Sidak para determinar si existían diferencias entre pares de tratamientos. **Resultados:** al comparar cada tratamiento con el control negativo existen diferencias significativas ($p < 0.05$), por lo que las tres concentraciones del enjuague de *Salvia officinalis* presentan un efecto inhibitorio; al comparar cada enjuague con el control positivo ($p < 0.05$) el efecto de este a sus diferentes concentraciones no iguala los valores de la clorhexidina al 0.12%. **Conclusiones:** el enjuague bucal de *Salvia officinalis* tiene efecto inhibitorio sobre la bacteria de *Streptococcus mutans* por lo que se podría utilizar como complemento de los métodos convencionales de control de la placa contra la caries dental.

Palabras clave: enjuague de *Salvia officinalis*, *Streptococcus mutans*, caries.

ABSTRACT

Introduction: Oral self-care for caries control is essential for its prevention. One of the natural alternatives used for this is *Salvia officinalis*, recognized as antibacterial, antifungal and astringent; in addition, due to its low cost, it represents an effective and accessible alternative for a large part of the population. **Objective:** To evaluate the effectiveness of *Salvia officinalis* mouthwash on the reduction of *Streptococcus mutans*. **Material and methods:** The present study is an experimental research design, of a relational level with a prospective data collection planning, cross-sectional and analytical. A strain of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175),

* Egresada de la Maestría en Ciencias Odontológicas con acentuación en Odontología Infantil, Facultad de Odontología Unidad Torreón, Universidad Autónoma de Coahuila.

** Coordinadora de la Maestría en Ciencias Odontológicas con acentuación en Odontología Infantil, Facultad de Odontología Unidad Torreón, Universidad Autónoma de Coahuila.

*** Cuerpo Académico de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

**** Cuerpo Académico Odontología Multidisciplinaria, Facultad de Odontología Unidad Torreón, Universidad Autónoma de Coahuila.

Correspondencia: Nadia Stephany Orihuela Mendoza.

Plutarco Elías Calles Núm. 21, Plan de San Luis. Torreón, Coah., México. Correo electrónico: nadia_tqp@hotmail.com

and *Salvia officinalis* rinse at 5, 10, and 100% were used. The extract was obtained by ethanoic extraction and then pass to an evaporative phase. Chlorhexidine at 0.12% was used as a positive control and distilled water as a negative control. For the hypothesis test, the ANOVA tests and Sidak's multiple comparisons were applied to determine if there were differences between pairs of treatments. **Results:** When comparing each treatment with the negative control, there are significant differences ($p < 0.05$) so that the three concentrations of the *Salvia officinalis* mouthwash present an inhibitory effect. When comparing each rinse with the positive control ($p < 0.05$), the effect of this at its different concentrations does not equal the values of 0.12% chlorhexidine. **Conclusions:** *Salvia officinalis* mouthwash has an inhibitory effect on *Streptococcus mutans* bacteria, so it could be used as a complement to conventional plaque control methods against dental caries.

Key words: *Salvia officinalis* rinse, *Streptococcus mutans*, caries.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es el principal padecimiento odontológico en el mundo y afecta entre el 95 y 99% de la población mundial, está presente tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo.¹ Las bacterias que se relacionan con mayor frecuencia con el inicio y desarrollo de la caries son: estreptococos del grupo *mutans*, *Lactobacillus* sp., y *Actinomyces* sp., los cuales pueden ser aislados a partir de placa dental supra y subgingival, también en saliva.^{2,3}

Siendo la placa bacteriana considerada un factor etiológico para la caries, el autocuidado oral para el control de la misma es un paso esencial en su prevención.^{4,5} Para la eliminación de estas bacterias existen antimicrobianos (antibacterianos), así como también los que actúan sobre virus, hongos y parásitos. La medicina natural, a partir de las plantas y sus propiedades antimicrobianas, recientemente ha recibido mucha atención por parte de los científicos, ya que presentan actividad antibacteriana capaz de combatir a agentes patógenos como el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, siempre que sean consideradas como coadyuvantes de un control mecánico de la biopelícula por medios físicos como el cepillado y el uso de hilo dental.^{5,6}

Las plantas han sido empleadas durante miles de años en muchas partes del mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales. En los últimos años se ha estudiado el efecto en la salud de los posibles compuestos bioactivos presentes en las plantas y es posible asegurar que existe más información sobre sus propiedades funcionales, medicinales y/o toxicológicas.⁷ Ejemplo de ello es la *Salvia officinalis*. Diversas publicaciones han demostrado la efectividad de los preparados de salvia como antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, astringente, estimulante y antiperspirante.⁸⁻¹⁰

La población necesita alternativas de tratamiento de bajo costo y alto beneficio, siendo accesible a las clases más populares para el tratamiento de lesiones bucales. Es por estos antecedentes que en el presente trabajo de investigación se comprobará la eficacia antibacteriana de un enjuague bucal elaborado a base de extracto de salvia (*Salvia officinalis*), frente al *Streptococcus mutans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio trata de un diseño de investigación experimental, de un nivel relacional con una planificación de toma de datos prospectiva, transversal y analítica. Se utilizó la cepa bacteriana identificada ATTC® 25175™ *Streptococcus mutans* adquirida en el Centro de Microbiología Aplicada S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México. Se llevó a cabo la elaboración del extracto y el enjuague de *Salvia officinalis* a diferentes concentraciones en el laboratorio de biotecnología y bioenergía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coah., México, durante el periodo agosto-septiembre de 2020.

Para preparar el extracto, la presente investigación se basó en el estudio hecho por Beheshti-Rouy y col.¹¹ en 2015 “*The antibacterial effect of sage extract (Salvia officinalis) mouthwash against Streptococcus mutans in dental plaque: a randomized clinical trial*”. Se cortaron en trozos pequeños las hojas de la planta *Salvia officinalis*, la cual fue adquirida en un centro comercial de Torreón, en el departamento de frutas y verduras; se dejaron macerar 50 g de hojas en 1500 ml de disolvente (50% de agua/50% de etanol [96%]) en un aparato agitador (KJ-201BD *Orbital Shaker*) a 90 rpm durante 48 h. Posteriormente, la solución obtenida fue filtrada en papel filtro y en membrana de nylon con porosidad de 5 µm y se transfirió a un aparato termoagitador magnético para separar el disolvente del extracto. Se preparó el enjuague bucal de salvia al 5% (5 ml de extracto en 95 ml de agua destilada), al 10% (10 ml de extracto en 90 ml de agua destilada) y al 100% (100 ml de extracto puro), cada uno fue vertido en un contenedor para su almacenamiento.

Para la preparación de la suspensión bacteriana la cepa bacteriana identificada ATTC® 25175™ *Streptococcus mutans* fue resuspendida en 5 ml de medio infusión cerebro corazón (BHI), se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.5.

Una vez obtenido el enjuague de *Salvia officinalis* a sus diferentes concentraciones y preparada la suspensión bacteriana, se procedió a la evaluación del potencial antibacteriano del enjuague de *Salvia officinalis*, el cual se realizó por el método de difusión en pozos; se emplearon placas con 25 ml de medio de cultivo agar BHI a la mitad de la fuerza, donde se agregaron

100 µL de una suspensión de *Streptococcus mutans* con una OD de 0.5. Posteriormente, se hicieron cinco pozos en el medio de cultivo; tres para las diferentes concentraciones del enjuague de *Salvia officinalis*, uno para el control positivo (clorhexidina al 0.12%) y uno para el control negativo (agua destilada). En cada pozo se depositaron 70 µL de la solución correspondiente, tras lo cual las placas inoculadas fueron refrigeradas a 4 °C por tres horas para su difusión e incubadas a 37 °C por 24 y 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación la actividad antibacteriana se detectó por la presencia de una zona clara de inhibición alrededor del pozo y estos halos fueron medidos con un vernier. Se realizaron cuatro repeticiones para obtener menos variaciones.

El seguimiento rutinario del crecimiento bacteriano se efectuó por turbidimetría, en un espectrofotómetro, la referencia utilizada fue en todos los casos el mismo medio de cultivo.

En matraces de 250 ml, que serán llamados reactores, se agregaron 50 ml de medio líquido BHI por cada tratamiento. Seguidamente, fueron incubados con 100 µL de un preinóculo de solución de células de *Streptococcus mutans*, cada hora se tomaron 750 µL de muestra y se vertieron en celdillas para medir su OD en el espectrofotómetro por un periodo de 24 h.

Para el análisis estadístico los resultados de las mediciones hechas en el laboratorio se registraron en una hoja de Excel V. 2016 (Microsoft, Inc, Redmond, Wash), luego se exportó al programa GraphPad Prism® versión 8 (software GraphPad, La Jolla, California, EE.UU.). Para la prueba de hipótesis se aplicó la prueba de ANOVA, luego se hicieron las comparaciones múltiples para determinar si existen diferencias entre pares de tratamientos. Además, se calculó la estadística descriptiva: media y desviación estándar.

RESULTADOS

La media y desviación estándar de los halos de inhibición para cada tratamiento y el control positivo tomando en cuenta las cuatro repeticiones realizadas en el experimento se observan en el **cuadro y figura 1**. El promedio con el valor más elevado es para la clorhexidina comercial (control positivo) a las 48 h con un halo de inhibición de 30.64 mm seguido por el enjuague de *Salvia officinalis* al 100% a las 48 h con un halo de inhibición de 19.43 mm, teniendo el valor más bajo el enjuague al 5% a las 24 h dentro de los reactivos de inhibición con un halo de 13.74 mm. Además, se observa que el tiempo tiene efecto en la variable de respuesta.

Estableciendo que:

H_0 : no existe efecto inhibitorio

H_1 : al menos existe un grupo que presenta efecto inhibitorio

En el **cuadro 1** se reporta el p valor que es < 0.05 , por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que al menos en un tratamiento existe un efecto inhibitorio. Para determinar cuál del tratamiento presenta efecto inhibitorio se empleó el método de comparaciones múltiples Sidak incluyendo aquí el control negativo (agua destilada).

Se hizo una comparación múltiple entre los tratamientos, y los resultados se muestran en los **cuadros 2 y 3**. De acuerdo con el P valor existen diferencias significativas entre todas las variables analizadas, incluyendo los controles positivo y negativo.

Debido a que el p valor es < 0.05 comparando cada tratamiento con el control negativo (agua destilada) existen diferencias significativas, por lo que las tres concentraciones del enjuague de *Salvia officinalis* presentan un efecto inhibitorio.

Finalmente, se comparó cada enjuague con el control positivo (clorhexidina) y el valor $p < 0.05$, lo cual indica que el efecto de este enjuague en sus diferentes concentraciones no iguala los valores de la clorhexidina al 0.12%.

Adicionalmente, se analizaron las curvas de crecimiento bacteriano midiendo la OD en el espectrofotómetro con los enjuagues a sus diferentes concentraciones, así como los controles positivo y negativo durante 24 h y los resultados se señalan en la **figura 2**.

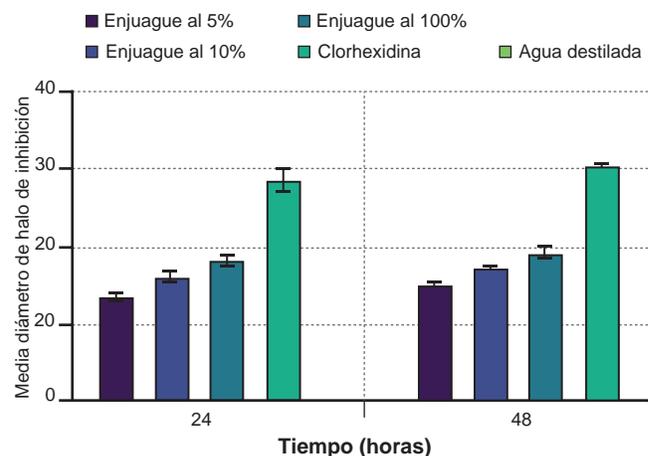


Figura 1. Halos de inhibición en diferentes condiciones.

Cuadro 1. ANOVA de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas.

Tiempo	Enjuague al 5%	Enjuague al 10%	Enjuague al 100%	Clorhexidina comercial	Valor P
24 h	13.74 ± 0.37	16.20 ± 0.75	18.24 ± 0.65	28.70 ± 1.4	0.0001
48 h	15.28 ± 0.39	17.25 ± 0.39	19.43 ± 0.76	30.64 ± 0.18	

Todas las concentraciones analizadas del enjuague de *Salvia officinalis* ejercen efecto en el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* y a mayor concentración mayor efecto antibacteriano, gráficamente se observa que la clorhexidina comercial impide el crecimiento de la bacteria desde la primera hora y permanece constante hasta las 24 h. Con los enjuagues a sus diferentes concentraciones se observa que el crecimiento ocurre de una forma más lenta conforme avanza el tiempo medido en horas, y el enjuague de *Salvia officinalis* al 100% es el más eficiente de estos.

DISCUSIÓN

Para la presente investigación se utilizó como control negativo el agua destilada, la cual no formó halo inhibitorio en ninguno de los ensayos, manteniéndose constante de 0 mm, lo que garantiza la siembra bacteriana y que la formación de los halos inhibitorios alrededor de los pozos llenados con el enjuague de *Salvia officinalis* en sus diferentes concentraciones fueron formados por esta sustancia.

Existen pocos estudios de *Salvia officinalis* en los que se analice como agente antibacteriano contra *Streptococcus mutans*; sin embargo, se han reportado numerosas investigaciones en donde se analizan sus diversas propiedades.^{12,13}

Marin G.¹⁴ (2016) comprobó la eficacia de los extractos acuosos al 100% de *Salvia officinalis* (salvia), *Rosmarinus officinalis* (romero) y de salvia con romero sobre el *Streptococcus mutans in vitro*. En la acción bacteriana del extracto acuoso de *Salvia officinalis* al 100% sobre *Streptococcus mutans*, existe una diferencia en las medias a las 24 y 48 h siendo de 12.65 y 15.35 mm, respectivamente; mientras que el romero al 100% a las 24 y 48 h (6.15 = 6.15) y en el caso de romero más salvia 100% sus medias a 24 y 48 h (12.60 a 15.40). En este estudio se concluye que el extracto acuoso de salvia al 100% fue mejor bactericida combinado con el romero. Los resultados del extracto acuoso de *Salvia officinalis* al 100%

en dicha investigación coinciden con los del presente estudio al probar que existe un efecto del extracto sobre la bacteria de *Streptococcus mutans*; no obstante, nuestro enjuague al 100% mostró un halo de inhibición mayor (18.24 y 19.43 mm) al reportado en este estudio, también se concluyó en la presente que el factor tiempo sí tiene efecto en la variable de respuesta.

Hmeem Al-Lamy y col.¹⁵ (2012) en su investigación “Antibacterial efficiency of *Salvia officinalis* extracts and their effect on growth, adherence and acid production of oral Mutans Streptococci” compararon las propiedades anticariógenas del extracto de salvia acuosa y alcohólica sobre la principal bacteria cariogénica en la cavidad oral (*Streptococcus mutans*); en este estudio, los *Streptococcus mutans* se aislaron de la saliva de estudiantes de odontología de entre 21-23 años de edad. Estas bacterias fueron aisladas, purificadas y diagnosticadas según pruebas morfológicas, características y

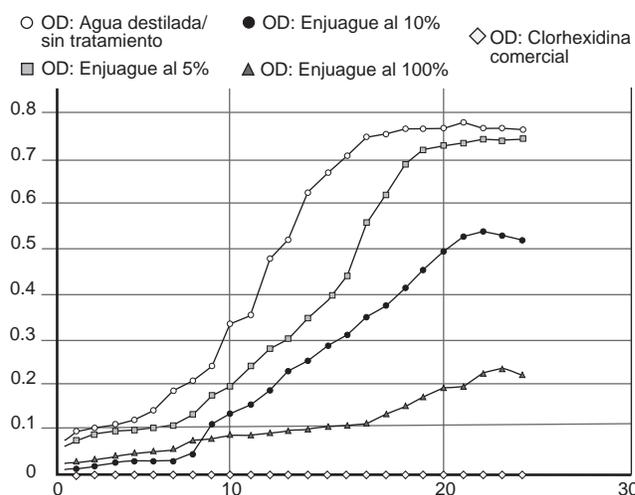


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Streptococcus mutans* en diferentes condiciones con enjuague de extracto de salvia.

Cuadro 2. Comparación múltiple Sidak a 24 horas.

Tratamientos a 24 h	P valor
Enjuague al 5% vs. enjuague al 10%	0.0002
Enjuague al 5% vs. enjuague al 100%	< 0.0001
Enjuague al 5% vs. clorhexidina	< 0.0001
Enjuague al 5% vs. agua destilada	< 0.0001
Enjuague al 10% vs. enjuague al 100%	0.0021
Enjuague al 10% vs. clorhexidina	< 0.0001
Enjuague al 10% vs. agua destilada	< 0.0001
Enjuague al 100% vs. clorhexidina	< 0.0001
Enjuague al 100% vs. agua destilada	< 0.0001
Clorhexidina vs. agua destilada	< 0.0001

Cuadro 3. Comparación múltiple Sidak a 48 horas.

Tratamientos a 48 h	P valor
Enjuague al 5% vs. enjuague al 10%	0.0032
Enjuague al 5% vs. enjuague al 100%	< 0.0001
Enjuague al 5% vs. clorhexidina	< 0.0001
Enjuague al 5% vs. agua destilada	< 0.0001
Enjuague al 10% vs. enjuague al 100%	0.0010
Enjuague al 10% vs. clorhexidina	< 0.0001
Enjuague al 10% vs. agua destilada	< 0.0001
Enjuague al 100% vs. clorhexidina	< 0.0001
Enjuague al 100% vs. agua destilada	< 0.0001
Clorhexidina vs. agua destilada	< 0.0001

bioquímicas. Mediante la técnica de difusión en agar mostró que los extractos de salvia (acuosa y alcohólica) inhibían el crecimiento de *Streptococcus mutans*, y el diámetro de la zona de inhibición aumentaba a medida que aumentaba la concentración de extracto de salvia coincidiendo estos resultados con los de la presente investigación en donde se observa que la concentración del enjuague tiene efecto en la variable de respuesta.

A pesar de que en este estudio ninguna de las concentraciones utilizadas del enjuague de *Salvia officinalis* tiene un efecto igual o mayor al de la clorhexidina al 0.12%, es conocido que esta última tiene efectos adversos al ser utilizada de manera rutinaria.¹⁶

CONCLUSIÓN

El enjuague bucal de *Salvia officinalis* tiene efecto inhibitorio sobre la bacteria de *Streptococcus mutans*, por lo que se podría utilizar como complemento de los métodos convencionales de control de la placa contra la caries dental. De los resultados mostrados se concluye que tanto el enjuague como el tiempo tienen efecto sobre la variable de respuesta. Aunque la clorhexidina tiene un papel comprobado en la reducción de la acumulación de placa y los niveles de *Streptococcus mutans*, la tinción de los dientes es el principal factor limitante para su uso diario, al igual que la pérdida de gusto y sensación de quemazón en la cavidad oral. El enjuague bucal de *Salvia officinalis* al 100% fue el más efectivo ante la inhibición de *Streptococcus mutans*; sin embargo, las tres concentraciones analizadas mostraron resultados positivos en cuanto al halo de inhibición.

Se recomienda realizar más estudios que comparen el efecto del enjuague bucal de *Salvia officinalis* con los enjuagues bucales estándar de oro, además de analizarlo sobre otros patógenos de la microflora oral. Se recomienda también extrapolar esta investigación hacia una aplicación clínica debido a los resultados satisfactorios obtenidos; el siguiente paso es diseñar investigaciones más complejas, pruebas *in vivo* y clínicas para examinar el papel de *Salvia officinalis* en formulaciones de productos comerciales para práctica médica y dental.

Considerando las limitaciones del presente estudio, se concluyó que el enjuague bucal de *Salvia officinalis* ejerce una acción antibacteriana contra *Streptococcus mutans* y puede considerarse una alternativa para desarrollar agentes antimicrobianos novedosos y efectivos contra la caries dental.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Todos los autores han hecho una contribución sustancial a este estudio y todos han revisado el documento final antes de su presentación.

REFERENCIAS

1. Frazão P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. *Braz Oral Res.* 2012; 26(Suppl 1): 108-14.
2. Liébana-Ureña J. *Microbiología Oral.* 2a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 2002.
3. Montes de Oca MA. Placa bacteriana. *Rev. costarric. cienc. med.* 1989; 10(1): 35-41.
4. Axelsson P, Lindhe J. The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1981; 8(4): 281-94.
5. Barnett ML. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134(6): 699-704.
6. Moromi H, Martínez Cadillo E, Ramos Perfecto D. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Odontol sanmarquina.* 2009; 12(1): 25-8.
7. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1992; 32(1): 67-103.
8. Baricevic D, Sosa S, Loggia RD, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 2001; 75(2-3): 125-32.
9. Ghorbani A, Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med.* 2017; 7(4): 433-40.
10. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(19).
11. Beheshti-Rouy M, Azarsina M, Rezaie-Soufi L, Alikhani MY, Roshanaie G, Komaki S. The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial. *Iran J Microbiol.* 2015; 7(3): 173-7.
12. Narayanan N, Thangavelu L. *Salvia officinalis* in dentistry. *Dent Hypotheses.* 2015; 6(1): 27-30.
13. López-De Ávila LM, Castaño-Peláez HI, Mejía-Gómez CE. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimento. *Actual Biol.* 2013; 35(98): 77-83.
14. Lanás-Terán GA, Marín-Vega GX. Efectividad del extracto acuoso de salvia, romero y de salvia-romero al 100% como bactericida sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio microbiológico *in vitro*. [trabajo de investigación como requisito previo a la obtención del grado académico de Odontóloga. Carrera de Odontología]. Quito: Universidad Central de Ecuador, 2016.
15. Hmeem Al-Lamy, Al-Mizraqchi AS. Antibacterial efficiency of salvia officinalis extracts and their effect on growth, adherence and acid production of oral Mutans Streptococci. *J Bagh College Dentistry.* 2012; 24(1): 153-7.
16. Naverac-Aznar M, de Grado-Cabanilles P, Gil-Loscos F. Uso de colutorios en la clínica periodontal. *Periodoncia y Osteointegración.* 2007; 17(1): 41-5.