



**Universidad
Norbert Wiener**

UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

“EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS

DE *Rosmarinus officinalis* (Romero) Y EL DIGLUCONATO DE

CLORHEXIDINA AL 0,05 Y 0,12% MAS CLORURO DE

CETILPIRIDINIO 0,05% SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

Presentado por:

AUTOR: LEON ROMERO, AGUSTIN FELIX

ASESOR: Dra. CHAVEZ FLORES, JUANA ELVIRA

LIMA – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la vida, salud plena y guiarme en el logro de mis objetivos.

A mi madre Priscila Romero, por su apoyo, comprensión en todo momento y a mi padre Eusebio León que está en el cielo por sus enseñanzas .A mis hermanos Lorenzo, Marcelo, Martin, Miguel, Marco, José, Claudio y mis hermanas María, Perla y Susan por alentarme siempre a que se materialicen mis sueños en realidad a pesar de las dificultades.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Juana Elvira Chávez Flores por orientarme durante el desarrollo y ejecución de la tesis.

A todo los docentes de la universidad Privada Norbert Wiener quienes me transmitieron su conocimientos en mi formación académica, personal y profesional.

A los miembros del Jurado por su tiempo brindado.

A los colaboradores de material didáctico y de laboratorio de microbiología por su apoyo en la ejecución de mi tesis

ASESORA

Dra. Juana Elvira Chávez Flores

JURADO

Presidente: Dra. Aguirre Morales, Anita Kori

Secretario: Mg. Jacinto Hervias, Pedro

Vocal: Mg. Barra Hinostroza, Melissa Allisson

INDICE

	Pág.
Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Asesor	iv
Jurado	v
Índice	vi
Índice de Tablas/Gráficos	vii
Resumen	viii
Summary	ix
CAPITULO I: EL PROBLEMA	
1.1. Planteamiento del problema	15
1.2. Formulación del problema	16
1.3. Justificación	17
1.4. Objetivos	18
1.4.1. Objetivo general	18
1.4.2. Objetivo específicos	18
CAPITULO II: MARCO TEORICO	
2.1. Antecedentes	20
2.2. Bases teóricas	32

2.3. Terminología básica	55
2.4. Hipótesis	57
2.5. Variables	57
CAPITULO III: DISEÑO Y METODO	
3.1. Tipo y nivel de investigación	59
3.2. Ámbito de la investigación	59
3.3. Población y muestra	59
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	61
3.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico	63
3.6. Aspectos éticos	64
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1. Resultados	66
4.2. Discusión	72
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	80
5.2. Recomendaciones	81
CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y ANEXOS	
6.1. Referencias bibliográficas	83
6.2. Anexos (Pág. 88 - 117)	88

Índice Tablas/Gráficos

	Pág.
Tabla 1: Estadísticas descriptivas del diámetro de halo de inhibición mm	66
Grafico 01: Grafica de medias del diámetro de halo de inhibición mm de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) EtOH 25, 50 y 100% (0,25 y 0,50 mg/mL).	67
Tabla 02: Pruebas de normalidad diámetro de halo de inhibición mm.	68
Grafico 02: Diagrama de cajas del diámetro de halo de inhibición mm	69
Tabla 03: Prueba de Kruskal Wallis	69
Tabla 04: Comparaciones múltiples Games-Howell.	70
Tabla 05: Escala de Duraffourd.	71

RESUMEN

La presente investigación fue ejecutado en los laboratorio de investigación y microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener, el objetivo fue comparar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y el Digluconato de Clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* estudio comparativo in vitro. Es un estudio de tipo experimental in vitro, prospectivo y transversal. Se realizó con una muestra de 21 discos por cada concentración, cada concentración consta de tres placas Petri la muestra total fue de 126 discos. Grupo blanco H₂O, los grupos controles fueron Digluconato de Clorhexidina 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% y tres concentraciones de ext. EtOH de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) 25, 50 y 100% (0,25, 0,50 mg/mL y 1g/mL); el medio usado fue agar Mueller Hinton-sangre 5% y la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175. A cada disco se le aplico 10 microlitros de las soluciones. Los resultados después de 48 horas mostraron que el H₂O bidestilada no mostro halo de inhibición, con respecto a los extractos: al 25, 50 y 100% las medias de sus halos fueron 15,19, 15,67 y 16,00 mm y con respecto a sus (s) 0,81, 0,48 y 1,34. Por otra parte las medias de halo de inhibición del Digluconato de Clorhexidina 0,05 y 0,12% más Cloruro de cetilpiridinio 0,05% fueron 16,75 y 16,95 mm con (s) 0,83 y 0,87. De acuerdo a la escala de Duraffourd los extractos y el control positivo están en el rango de 15 mm a 19 mm que corresponde a efecto inhibitorio muy sensible. Concluyendo que los extractos etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 25, 50 y 100% y el Digluconato de CHX 0,05% y 0,12% mas CPC 0,05% presentan efecto

inhibitorio estadísticamente comparable muy sensible sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Palabras clave: Inhibición, halo, *Streptococcus mutans*, Escala de Duraffourd.

SUMMARY

The present research was carried out in the research and microbiology laboratories of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Private University Norbert Wiener, the objective was to compare the inhibitory effect of the ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* leaves (Rosemary) and Chlorhexidine digluconate 0,05 and 0,12% plus Cetylpyridinium chloride 0,05% against *Streptococcus mutans* in vitro comparative study. Is an experimental, in vitro, prospective and transversal study. Was done with a simple of 21 discs for each concentration, each concentration consists of three Petri dishes the total simple was 126 discs. H₂O White grup, control group Chlorhexidine digluconate 0,05 and 0,12% plus Cetylpyridinium chloride 0,05% and three concentrations of ethanol extract from the leaves of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) 25, 50 and 100% (0,25, 0,50 mg/mL and 1g/mL); the culture medium was agar Mueller Hinton - blood 5% and the strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175. 10 microliters of the solutions were applied to each disk. The results after 48 hours showed that the bidistilled H₂O showed no halo of inhibition, with respect to the extracts to 0,25, 0,50 and 100% the means of their halos were 15,19, 15,67 and 16,00 mm and with respect to their (s) 0,81, 0,48 and 1,34. On the Other hand, the inhibition halo means of chlorhexidine digluconate 0,05 and 0,12% plus Cetylpyridinium chloride 0,05% were 16,75 and 16,95 mm with (s) 0,83 and 0,87. According to the Duraffourd scale, the extracts and the positive control are in the range of 15 mm to 19 mm, which corresponds to a very sensitive inhibition effect. Concluding that the ethanolic extracts of the leaves of *Rosmarinus officinalis* (Romero) at 25, 50 and 100% and chlorhexidine digluconate 0,05 and 0,12% plus Cetylpyridinium chloride

0,05% present a statistically comparable inhibitory effect very sensitive about the *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Keywords: Inhibition, halo, *Streptococcus mutans*, Duraffourd scale

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema.

Las plantas medicinales han sido usadas desde tiempos remotos por nuestros ancestros con fines de aliviar sus dolencias, esta información ha sido transmitida oralmente hasta nuestros días, por esta razón hay poca información científica que corrobore la actividad terapéutica de estas plantas medicinales en odontología.

En el Perú son usadas algunas plantas en formulaciones farmacéuticas, como pasta dentales, soluciones tópicas, enjuagues bucales, colutorios y otros. Los beneficios para la sociedad es tanto en lo económico y terapéutico¹.

La solución a los problemas de salud pública relacionada a enfermedades bucodentales debe ser tratada con el mismo énfasis que las enfermedades crónicas. Por este motivo los programas de OMS con respecto a la salud bucodental están enfocados en la prevención de enfermedades crónicas y la promoción de la salud, a pesar de esto reporta que los escolares presentan caries dental entre 60 – 90% mientras en adultos es el 100% a nivel mundial².

El *Streptococcus mutans* es una de las bacterias causantes de la caries dental el cual se adhiere en el biofilm y luego formaran la placa dental².

Rosmarinus officinalis (Romero) tiene actividad antiinflamatoria y antiséptica, estas especies serian una alternativa de elección en la inhibición de la placa dentobacteriana. Frente a *Streptococcus mutans* que son causantes de la caries dental, en investigaciones realizadas “*in vitro*” con extracto se ha demostrado que tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* también presenta actividad antiinflamatoria, en investigaciones realizadas “*in vitro*” con el

extracto se ha demostrado que tiene actividades bactericidas y bacteriostáticos a concentraciones bajas contra los *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. La caries dental es causado por el microorganismo *Streptococcus mutans*, lo cual es un indicador para planificar las medidas de prevención con el fin de eliminar o disminuir la incidencia de caries, por este motivo, usamos antibacterianos y antisépticos artificiales en diferentes presentaciones, igualmente es importante la técnica de cepillado para la eliminación de placa bacteriana. Recientemente se ha dado mayor importancia a las plantas medicinales para el uso intraoral con fines anticariógena por tener actividad antibacteriana.

1.2. Formulación del problema.

1.2.1. Problema general

¿Existe efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) y el Digluconato de Clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 estudio comparativo in vitro?

1.2.2. Problema específico

1. ¿Tendrá efecto inhibitorio el extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

2. ¿Tendrá efecto inhibitorio el Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.3. Justificación

El presente estudio se enfocara en la actividad anticariogenica del extracto etanólico de las hojas de Romero sobre *Streptococcus mutans* con la finalidad de mejorar la salud bucal de la sociedad; según a la OMS (nota informativa N°318) la caries dental no a disminuido, esta entre el 60-90% de escolares y casi el 100% de los adulto². Al ser la caries una enfermedad prevalente es necesario investigar otras alternativas de solución. Como el uso del extracto etanólico de Romero en sus forma farmacéutica para lograr reducir la cantidad de *Streptococcus mutans* y por ende disminuir la caries dental.

En el ámbito clínico el extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) posee actividad bactericida y bacteriostática sobre la flora oral dependiendo de la concentración será la efectividad del tratamiento. De acuerdo a la información de la dirección de salud bucal del Ministerio de Salud (Minsa) el 85% de niños y niñas menores de 11años presentan caries dental y recomiendan pastas fluorada 1000 a 1500 ppm de flúor de acuerdo la “Guía de Práctica Clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la caries dental en niños y niñas” aprobado mediante R.M. 422-2017/Minsa y que recoge investigaciones de la comunidad científica mundial³. La importancia del estudio comparativo del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de las hojas Romero con el Digluconato de CHX mas CPC sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con el fin de dar a

conocer la propiedad terapéutica del Romero en la prevención y disminución del índice de caries dental; en el futuro tanto en la fase preclínica y clínica puedan ser aplicadas en sus formas farmacéuticas (Colutorios y pastas dentales). Finalmente masificarlo y hacerlo mas accesible a la población para su uso.

Este trabajo es viable y factible porque se cuenta con el presupuesto y recursos necesarios para su ejecución; la presente investigación servirá como fuente de información para estudios posteriores con fines académico de tipo científico por tener la característica de ser reproducible.

1.4. Objetivo

1.4.1. General

Comparar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) y el Digluconato de Clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 estudio comparativo in vitro.

1.4.2. Específicos:

1. Evaluar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. Evaluar el efecto inhibitorio de Digluconato de Clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

Ortega E. (2016) en la presente investigación. “Efectividad de inhibición del extracto de Tomillo y Romero (al 10%) frente al *Streptococcus mutans* en 20 muestras. **Objetivo:** Comprobó la actividad de inhibición de los extractos de Tomillo y Romero (al 10%) frente al *Streptococcus mutans*, en 20 muestras. **Método:** La presente investigación se realizó in vitro con 20 muestras, en el Laboratorio SAFEM ubicado entre Caccha N3257 y Princesa Toa, de la ciudad de Quito. Este trabajo de tipo experimental, donde se midieron los halos de inhibición en las ambas soluciones acuosas, clorhexidina al 2% y agua destilada, sobre el medio de cultivo Mueller Hinton con *Streptococcus mutans*. **Resultados:** Las medias del diámetro de los halos de inhibición tanto del extracto de Tomillo y Romero fueron de 6 mm. Estos valores se encontró por debajo; por tanto, la sensibilidad de la bacteria ante esta sustancia fue nula y en cambio la clorhexidina al 2% fue 17,3 mm. **Conclusiones:** Los extractos de Tomillo y Romero al 10% no poseen un efecto inhibitorio in-vitro de la bacteria *Streptococcus mutans*, al recurrir a un medio de cultivo que podría semejar las condiciones de la boca ⁴.

Alves M, Higino J, Eleuterio P, Crovella S, Caldas A y Tavares A. (2016) “dentífrice Containing extract of *Rosmarinus officinalis* Linn. An Antimicrobial Evaluation”. **Objetivo:** Evaluarón la actividad antimicrobiana de un dentífrico que contenía el extracto alcohólico de Rosemary en la flora bacteriana oral, comparado con un dentífrico herbal comercial. Sobre *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus oralis* (ATCC9811) y *Lactobacillus rhamnosus*

(ATCC7469). **Método:** Fuerón usados las diferentes pastas dentales como base: Rosemary (TR), propolio (TH), triclosan control positivo (TPC) y pasta sin flúor (control negativo) (TNC), las bacterias fueron sembradas en placas Petri y los discos fueron empapados con las diluciones de dentífrico y colocadas en las placas. **Resultados:** Analizaron los halos de inhibición. Se observó que TR no presentó diferencia estadística en relación con el TH para inhibir el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*, mientras que TH era más activo contra el *Lactobacillus rhamnosus*. **Conclusión:** La pasta dental que contiene extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) inhibió el crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Lactobacillus rhamnosus*, revelando una actividad antimicrobiana similar a las pastas dentales comerciales para la inhibición de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*⁵.

Marin G. (2016) “efectividad del extracto acuoso de *Salvia*, Romero y de *Salvia-Romero* al 100% como bactericida sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio microbiológico in vitro”. **Objetivo:** Comprobó la eficacia de los extractos acuosos al 100% de *Salvia officinalis* (*Salvia*), de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y de *Salvia* con Romero en la inhibición del desarrollo de *Streptococcus mutans*. **Método:** Se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas de la Publica Universidad Central Ecuador. Es un estudio transversal, comparativo, experimental, in vitro, se realizó con una muestra de 15 cajas Petri con agar sangre de cordero 5%, 5 cajas Petri por extracto. **Resultados:** Lo que dio como resultado de 60 muestras, los resultados indicaron que el efecto bactericida del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 100%

sobre el *Streptococcus mutans*, no presento halo de inhibición mayor a 6,15 mm después de las 24 h y 48 h. Los extractos acuosos de *Salvia officinalis* + *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 100% sobre el *Streptococcus mutans*, mostraron un halo de inhibición de 12,60 a las 24 horas y de 15,40 a las 48 horas, por otra parte el ext. H₂O de *Salvia Officinalis* (salvia) al 100%, sobre el *Streptococcus mutans*, mostró un halo de inhibición de 12,45 mm después de 24 h y 15,35 mm a las 48 horas. **Conclusiones:** No presenta diferencia significativa en la medida de sus halos de inhibición del Romero–Salvia y de la salvia pura y el extracto acuoso de Salvia 100% fue mejor bactericida que combinándolo con el Romero⁶.

Solano X, Moya T y Zambrano M. (2016) “inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de Romero (*Rosmarinus officinalis*), aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco”. **Objetivo:** Determinar la inhibición de crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* in vitro, con los extractos: Acuoso y oleoso de Rosemary. **Método:** Realizado en Facultad de Ciencia Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Se evaluó la acción antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con la técnica de difusión de discos papel. Se hicieron con dos grupos de 15 muestras; para el G1: Extr. H₂O de 1,5 y 3%, G2: Extr. Oleoso 50%. Como control positivo la Clorhexidina 0,12% y control negativo H₂O destilada. **Resultados:** Para la parte estadística se usó el test de U Mann Whitney con 5% del nivel de significancia. El extr. Acuoso y el H₂O destilada no tuvieron halo de inhibición 0 mm. Mientras el extr. Oleoso

elaborado tuvo una media de 11,93 mm de halo ($p < 0,001$), sin embargo la Clorhexidina tuvo una media de 16,13 mm ($p < 0,001$). El extr. Oleoso de Romero tuvo actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, siendo similar a la clorhexidina. **Conclusiones:** El H₂O y los extratos acuosos al 1,5 y 3% no presentan actividad antibacteriana, en cambio el extr, oleoso al 50% presenta una actividad antibacteriana similar al control clorhexidina⁷.

García MG, Zurlohe M, Montero E, Alonso B, Serrano J, Sanz M, et al. (2016)

“evaluation of new chlorhexidine and cetylpyridium chloride-based mouthrinse formulations adjunctive to scaling and root planing pilot study”. **Objetivo:**

Compararón el efecto de dos nuevas fórmulas de enjuagues bucales con clorhexidina (CHX) y cloruro de Cetilpiridinio (CPC) después del raspado y alisado radicular (SRP) en términos clínico. **Método:** El estudio fue realizado por el Postgrado Clínica de periodoncia, Universidad Complutense, Madrid (España).

Métodos un estudio piloto, ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, diseño paralelo con 1 mes de seguimiento se llevó a cabo. Pacientes crónico con periodontitis que requieren terapia periodontal no quirúrgica inscrito y asignado al azar a: (1) SRP y prueba -1 (la nueva reformulación: CHX 0,12% y Cetilpiridinio 0,05%); (2) SRP y prueba-2 (nuevo formulación: Clorhexidina 0,03% y 0,05% de Cetilpiridinio); o (3) SRP y positivo control (producto comercial: clorhexidina 0,12% y 0,05% de CPC). Se evaluaron al inicio y 1 mes después de SRP. Las variables cuantitativas se compararon mediante ANOVA o Kruskal- Prueba de Wallis y variables cualitativas por chi-cuadrado o pruebas de McNemar.

Resultados: Se incluyeron 30 pacientes (10 por grupo). Después de 1 mes, se

observó una reducción significativa de placa en cada grupo ($P = 0,016$) en el caso del grupo 1 mostró menos sitios con placa que el grupo 2 de 31,15% (S.E. 2,21%) contra 49,39% (S.E. 4,60%). No se encontraron diferencias significativas para el paciente global percepción del producto o en los efectos adversos. Grupos de prueba mostraron mejores resultados en niveles y proporciones ($P = 0,022$) de *Capnocytophaga spp.* **Conclusiones:** Se concluyó que la nueva formulación de enjuague bucal CHX 0,12% y CPC al 0,05% en conjunto con SRP mostró reducciones mayores del nivel de placa, sin mostrar efectos adversos, en comparación con los otros dos Enjuagues bucales, después de SRP. Las tres formulaciones demostraron ser seguros tanto clínico como microbiológico después del uso por 1 mes⁸.

Purca T. (2013) “efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre flora salival”. **Objetivo:** Determino la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra la flora salival. Método: la muestra fueron 22 pacientes de la Clínica de Odontología de la UNMSM. El método empleado fue de difusión tanto en pocillos y discos. Las muestras fueron encubadas a 37° C por 24 horas después hacer las mediciones de los halos con un calibrador. **Resultados:** Los microorganismos de la flora salival fueron susceptibles al extr. EtOH del Romero de acuerdo a las concentraciones: 25, 50 y 75 mg/mL y sus halos fueron: 12,47, 17 y 20,56 mm; la clorhexidina 0,12% fue 15,56 mm y con respecto al H₂O no presento efecto inhibitorio. **Conclusiones:** El extr. EtOH de Romero presenta efecto inhibitorio sobre la flora salival donde a mayor

concentración mayor halo inhibitorio; la lectura se interpreta: Nula = $0 < 8$ mm, sensible limite $9 - 14$ mm, sensible media $15 - 19$ mm y sumamente sensible = $0 > 20$ mm⁹.

Mostacero I, Bustamante O, Mostacero L, Carranza L y Ruiz M. (2013)

“efecto inhibitorio in vitro de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans*”.

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana del Romero contra *Streptococcus mutans*. **Método:** La infusión de Romero presenta actividad terapéutica dependiendo de la concentración 10, 20, 40% y el tiempo de exposición 60 y 300 segundos sobre la suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* al 3×10^7 UFC/mL. **Resultados:** Los resultados fueron tratados estadísticamente (ANOVA y Games-Howerd). La concentración al 40% *Rosmarinus officinalis* (Romero) tuvo mayor actividad con una media 20530000,00 y con una diferencia significativa de 0,0028 después de 60 y 300 segundos de exposición. Con respecto al 20% tuvo una media 2016666,67 luego de 60 y 300 segundos de exposición, mostrando una significancia de 0,0002 con relación al control. **Conclusiones:** La infusión de *Rosmarinus officinalis* (Romero) tiene la propiedad de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* dependiendo tanto de la concentración y al tiempo que expuesto¹⁰.

San Román I. (2013) “actividad inhibitoria del extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra bacterias anaerobias de la bolsa periodontal.

Objetivo: Determino el efecto antimicrobiano del extr. EtOH del Romero sobre bacterias anaerobias presentes en la bolsa periodontal. **Método:** Se tomaron muestra de la bolsa periodontal utilizando para esto conos de papel número 30

dejándolo durante 30 segundos y luego procesado en el laboratorio; se usó la técnica de pocillos donde se aplicó el extr. EtOH de Romero. Fueron encubados en anaerobiosis por 48 h a 37 °C y después se realizó las mediciones de los halos. **Resultados:** El H₂O destilada no presento halo de inhibición y con respecto a las concentraciones de los extractos 25 y 50 mg/ mL presentaron 9,10 y 11,45 mm. Por otra parte el extr. Al 75 mg/mL y la clorhexidina la 0,12% tuvieron las medias similares 13,35 y 13,43 mm de halo de inhibición. No hay una diferencia estadística significativa. **Conclusiones:** El extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* al 75 mg/mL presenta similitud a la clorhexidina 0,12% con respecto a la actividad antibacteriana frente a bacterias de presentes en la bolsa periodontal de paciente con gingivitis. A las concentraciones de 25 y 50 mg/ mL presentan un menor efecto¹¹.

Pinheiro M, Araujo D, Dantas L, Cavalcanti y Nascimento W. (2012) “efecto antimicrobiano de las tinturas de productos naturales contra las bacterias de la caries dental”. **Objetivo:** Evaluaron la actividad bactericida y bacteriostática de las tinturas Rosemary, *Mikania glomerata* (Guaco) y *Calendula officinalis* (Marigold) contra bacterias de la caries dental y comparados con la clorhexidina. **Método:** El estudio fue realizado in vivo determinándose la acción antibacteriana de los extractos de *Rosmarinus officinalis* Linn, (Romero), Marigold y Guaco sobre las bacterias del biofilm relacionados con la enfermedad periodontal y la caries. La muestra fueron 11 voluntarios divididos en 3 grupos: Grupo placebo, grupo control clorhexidina 0,12% (Gold standard) y Grupo de los extractos para un tratamiento de 3 faces durante 14 días. **Resultados:** Luego del tratamiento se

realizó índice IHO-S, fueron examinados clínicamente y estadísticamente. Al principio del estudio, 27% de los voluntarios demostraron buena higiene (promedio de IHO-S = 0,88) y 73% presentó una limpieza regular (promedio de IHO-S = 1,4). Después de usar la solución (placebo), 36% mantuvo la higiene regular y 64% tuvieron promedio = 0,95, clasificada como buena higiene. Después con la solución B (clorhexidina), 64% de los voluntarios presentadas desinfección clasificado tan buena con el OHI-S menos de 0,83 y 15 36% mantenido es correspondiente a la higiene regular, con promedio de 1,16. Después de usar la tercera solución, solución C (Extracto de Romero) 54% presentó buena higiene con un promedio de 0,83 y 45% regular con un promedio de 1,3. La concentración inhibitoria mínima (CMI) se determinó mediante la técnica de microdilución, microplacas de 96 pocillos. Pasado 24 h se realizó visualmente la lectura. Los ensayos se realizaron por triplicado. La CMB fue considerado en las placas que no mostró ningún crecimiento bacteriano. Como resultado Sobre *Streptococcus mutans*, CMI fue verificado a 6,25 mg/mL, T1, T2 y T3 y CMB 12,5 mg/mL para T1 y T2 y 6,25 mg/mL de T3. Sobre *Streptococcus oralis*, todos los productos presentan CMI y CMB en 0,78 mg/mL. De clorhexidina 0,12%, el CMI y CMB fueron 0,04mg/mL, sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. **Conclusiones:** Las tinturas de *Rosemary*, *Marigold* y *Guaco* mostraron actividad bactericida y bacteriostático a bajas concentraciones contra *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mutans*. Sin embargo la Clorhexidina fue superior a las tinturas¹².

Zohreh D, Aghazadeh M, Adibpour M, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Mosannen P, et al. (2011) "in vitro comparison of the Antimicrobial activity of ten

herbal extracts against *Streptococcus mutans* with Clorhexidina". **Objetivo:** Comparar la actividad antimicrobiana in vitro de diez extractos de plantas y la clorhexidina sobre *Streptococcus mutans*. **Método:** Realizado en el departamento de medicina oral, Mashad Iran. Se prepararon las placas y después de 24 horas, se realizaron las mediciones de los halos de inhibición. **Resultados:** El promedio de la media con respecto a la zona de inhibición para la clorhexidina fue de 14,06 mm, S.D.= 1,70 mm. Entre las plantas de prueba, hubo un halo indicativo de la falta de crecimiento alrededor de los discos; pero en el caso del Romero y Clavo de olor presentaron halo. La media de la zona inhibitoria relacionadas con Clavo de olor y Romero fue 15,26 mm; SD = 1,55 mm, y 11,52 mm; SD = 0,96 respectivamente. Se tomó una muestra de la zona de inhibición alrededor de cada planta para procedió a hacer un frotis y tinción con coloración Gram. Luego fue observado en el microscopio. El clavo de olor presento mayor halo de inhibición probablemente debido al pH ácido del clavo de olor produjo la lisis de medios de cultivo agar sangre. El pH del clavo de olor se determinó con el papel de cromatografía encontrándose entre 2,0 a 2,5. La clorhexidina es significativamente mayor que el Romero fue 11,52 con una SD = 0,96. El resultado de la actividad antibacteriana de 10 plantas contra *Streptococcus mutans* solo presentaron halo de inhibición 2 extractos el clavo de olor y el Romero. Mientras que los 8 restantes no presentaron halo. El diámetro de cada disco fue de 0,6 mm. **Conclusión:** El estudio demostró que *Rosemary* tiene actividad contra *Streptococcus mutans*. Si se confirma otros resultados similares en ensayos clínicos, estos extractos de plantas pueden usarse para producir nuevos colutorios antimicrobianos, útiles y económicos ¹³.

Battagin J. (2010) “cinética enzimática e efeito de extractos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*”. **Objetivo:** Investigo la actividad inhibitorio de los extractos vegetales sobre la actividad de glicosiltransferasa contra el desarrollo de *Streptococcus mutans* in vitro. **Método:** El uso de extractos de plantas ha atraído la atención de los investigadores en varios países, ya que pueden inhibir la actividad de la enzima Glucosiltransferasa (GTF) producido por el *Streptococcus mutans* y también directamente inhiben el crecimiento de estas bacterias. La investigación fue evaluar la actividad inhibitorio de los extractos vegetales: *Rosmarinus officinalis* Linn (Romero), *LLex paraguariensis* (Yerba mate) y *Camelia sinensis* (té verde) en la actividad de la Glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans*. Algunos de los parámetros cinéticos de la enzima también fueron estudiados. **Resultados:** El extr. H₂O de Romero demostró tener efecto inhibitorio sobre GTF de 50 a 75% en concentraciones mayores a 4 mg/mL. Por el contrario los demás extractos examinados fueron incapaces de inhibir el crecimiento bacteriano. **Conclusiones:** El extracto acuoso de Romero podría ser fuente para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas en la inhibición de la enzima GTF y consecuente inhibición de la síntesis de glucanos implicados en la formación de caries y el efecto inhibitorio sobre la actividad de la GTF verificado con el uso del extracto acuoso de Romero parece no estar relacionado con la concentración de compuestos fenólicos totales, pero posiblemente con la naturaleza de estos compuestos fenólicos presentes¹⁴.

Bernardes W, Lucami R, Tozatti M, Souza M, Andrade A, Da Silva A, et al. (2010) “antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens:

Relevance of Carnosic and carnosol” **Objetivo:** Evaluarón el efecto inhibitorio del extractos crudos de EtOH/H₂O de tallos y hojas de Romero sobre las bacterias causantes de caries dental: *Streptococcus mutans*, *mitis*, *salivarius*, *sanguinis*, *sobrinus* y *Enterococcus faecalis*. Método: Se determinaron la CMI con la técnica de microdilución en caldo. El extracto de las hojas tuvo mayor actividad bactericida que el extracto del tallo que se obtuvo por fraccionamiento (HPLC); se llegó a fraccionar 5 metabolitos: Acido carnosico y carnosol los principales que le dan la actividad antibacteriana, el ácido rosmarínico no mostro ninguna actividad antibacteriana. También se fracciono el ácido ursólico y oleanólico en baja cantidad. **Resultados:** El análisis HPLC de esta fracción mostró que sus principales compuestos son los ácido carnósico, t_R 32,16 y carnosol t_R 27,41 min. Respecto a sus propiedades antimicrobianas ambos mostraron efectos inhibitorios significativos contra los patógenos. Mostraron una mejor actividad antibacteriana que el timol, un agente antibacteriano comercialmente disponible, que se usó como control positivo. **Conclusión:** La actividad antimicrobiana de las hojas de *Rosmarinus officinalis* se le atribuye a los ácidos carnosico y carnosol sobre patógenos orales¹⁵. (ANEXO 1)

Castaño H, Ciro G, Zapata J y Jiménez S. (2010) “actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario”. **Objetivo:** Valorarón el efecto bactericida y determinar la CMI del aceite esencial y extr. EtOH de las hojas de Romero contra bacterias de interés alimentario. **Método:** Se realizó CMI del aceite y extr. EtOH de las hojas *Rosmarinus officinalis* L. sobre: *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria*

monocytogenes, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. **Resultado:** El aceite tiene efecto tanto para bacterias Gram positivas y negativas con CMI de 512 a 4096 ppm. Con respecto al extr. EtOH tuvo efecto sobre *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* con CMI de 1024 ppm. Para el control positivo fue la Nisina con una CMI 2 y 1024 ppm. El aceite de romero tiene un amplio espectro antibacteriano mejor los que usan el mercado. **Conclusiones:** Las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. tienen un aceite esencial de un amplio espectro como bactericida y mejor a los conservantes que hay en el mercado de interés alimentario. Con respecto al extr. EtOH es menor¹⁶.

Borges A, Aparecida C, Freire F, Junqueira J y Cardoso A. (2009) “actividad antifúngica de dos extractos glicolicos de *Rosmarinus officinalis* Linn y *Syzygium cumini* Linn. Contra cepas de *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*. **Objetivo:** Evaluarón el potencial antifúngica in vitro de dos extractos glicolicos de Romero y *Syzygium cumini* L. contra cepas clínicas de *Candida tropicalis* (n = 8), *Candida albicans* (n =14) y *Candida glabrata* (n = 8). Método: Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución seriada de los extractos (100 a 3125 mg/mL⁻¹) en caldo de enriquecimiento Sabouraud, que fueron inoculados con suspensiones fúngicas (10⁶ células.mL⁻¹) y se incubaron a 37 °C/24 horas. Después de la incubación, los ensayos de la prueba anterior que no demostró el crecimiento en caldo fueron sembrados en agar Sabouraud y se incubaron a 37 °C/48 horas para determinar la concentración fungicida mínima (MFC). **Resultados:** Para la mayoría de las cepas estudiada, el MIC del extracto de *Rosmarinus officinalis* Linn. Era similar al extracto de *Syzygium cumini* Linn.,

correspondientes a 25 mg.mL⁻¹ de *Candida albicans*, 25 mg.mL⁻¹ de *Candida glabrata* y 12.5 mg.mL⁻¹ de *Candida tropicalis*. El MFC de extracto de *Rosmarinus officinalis* Linn. y *Syzygium cumini* Linn. Fue, respectivamente, 25 y 50 mg.mL⁻¹ de *Candida albicans*, 50 mg.mL⁻¹ de *Candida glabrata* y 25 mg.mL⁻¹ de *Candida tropicalis*. **Conclusiones:** Los extractos glicolicos *Rosmarinus officinalis* Linn. y *Syzygium cumini* Linn. Presentarón potencial antifúngico para todas las cepas de *Candida* estudiadas y las cepas de *Candida* estudiadas, siendo que las cepas de *Candida tropicalis* que se muestra ser más sensible a los extractos en relación con *Candida albicans* y *Candida glabrata*¹⁷.

2.2. Base teórica

2.2.1. *Rosmarinus officinalis* (Romero)

2.2.2. Historia

El Romero es una hierba bien conocida y muy valorada, originaria del sur de Europa. Ha sido utilizada desde la antigüedad para mejorar y fortalecer la memoria. Aun hoy, en Grecia se quema en las casas de los estudiantes que preparan exámenes¹⁸.

Rosmarinus officinalis (Romero) ha sido nombrado la planta del año en 2001 por la Asociación Internacional de plantas medicinales. Fue introducido a Gran Bretaña por los Romanos y hoy aún particularmente es amado por los italianos y los británicos, que lo utilizan con frecuencia en su cocina. En la antigua Grecia y Roma el Romero creía que fortalecía la memoria, que es conocida como la hierba del recuerdo y la fidelidad. El Romero fue una parte esencial del repertorio

de la farmacia durante el renacimiento. Hipócrates, Galeno y Dioscórides prescribían el romero para problemas del hígado. El Romero no es una planta popular en la India. Fue introducido por los Europeos como una planta de jardín por sus hojas con aroma fragantes agradable¹⁹.

El Romero fue introducido nuestro país en el año 1579, es traído por los españoles desde la península Ibérica. A partir de esa época es cultivado en los huertos, también crece de manera silvestre debido a su gran adaptabilidad; es así, como se distribuye por todo el Perú⁹. Abarcando la costa, sierra y selva. hasta los 3,500 msnm, formando parte del sotobosque, en laderas de tierras bajas y en lugares secos (Cano 1994, Beltrán y Benavente 2001)²⁰.

2.2.3. Taxonomía

REINO: PLANTAE

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Rosmarinus*

ESPECIE: *Rosmarinus officinalis*

Nombre vulgar: “Romero”

(ANEXO 2. Clasificación taxonómica)

(ANEXO 3. *Rosmarinus officinalis*)

2.2.4. Descripción botánica

Arbusto que permanece verde todo el año. Ramas leñosas y de color parduzco. Alcanza 1,5 m de altura. Se ramifica abundantemente y sus ramas son cuadrangulares y están cubiertas de pelillos blanquecinos. Las hojas son estrechas y casi cilíndricas y de color verde por el haz y blanquecinas por el envés. Nacen enfrentadas y presentan el borde entero. Las flores nacen en cortos ramilletes axilares y son de color azul claro, rosa o blanquecino. El fruto está formado por cuatro nuececillas de color parduzco. Florece casi todo el año²¹.

El cáliz es de color verde oscuro o verdepardo, campanulado, bilabiado y está cubierto de tricomas tectores estrellados y glandulares; el labio superior es entero o algo escotado y el inferior tiene 2 lóbulos. La corola de 15 - 40 mm, es de color azul pálido, a veces blanquecina con manchas violáceas en el interior o rosada, bilabiada; el labio superior es bilobulado y el inferior trilobulado, con el lóbulo medio más largo y cóncavo; presenta tricomas tectores uniseriados y ramificados y tricomas glandulares en la superficie externa de los labios, las brácteas son lanceoladas y están cubiertas de tricomas tectores pluricelulares ramificados y las hojas son lineares, coriáceas, enteras, con márgenes revolutos, de colores verdes, brillantes, glabros y rugosos por el haz, surcado por el nervio medio y blanco tomentosas en el envés; con glándulas²².

2.2.5. Compuestos químicos principales:

Las hojas contienen hasta 2,5% de aceite esencial, cuya composición varía de acuerdo con el quimiotipo, y contiene alcanfor (5 - 31%), 1,8 - cineol (15 - 55%),

α -pineno (9 - 26%), borneol (1,5 - 5,0%), canfeno 82,5 - 12,0%), β - pineno (2,0 - 9,0%), limoneno (1,5 - 5,0%)), verbenona (2,2 - 11,1%), β - cariofileno (1,8 - 5,1%) y mirceno (0,9 - 4,5%). las hojas también contienen flavonoides con una aglicona metilada (por ejemplo, genkwanin y luteolina); ácidos fenólicos, particularmente rosmarínicos, clorogénicos y cafeicos; y terpenoides, que incluyen diterpenos (por ejemplo, carnosol, ácido carnosólico, rosmanol) y triterpenos (por ejemplo, ácidos oleanólico y ursólico)²³.

2.2.6. Características organolépticas

El Romero tiene un sabor ligeramente picante, amargo, de contextura áspero, de olor fuertemente aromático e intenso, especiado, algo alcanforado²².

2.2.7. Actividad farmacológica

Evidencia preclínica y mecanismos de acción: Un gran número de estudios ha resaltado las diversas acciones farmacológicas del romero, una selección de las cuales se resumen aquí²³.

Efectos diuréticos: actividad diurética de un extracto acuoso de (8%) de romero se demostró en un modelo de rata²³.

Efectos antiespasmódicos: Un estudio demostró que el extracto etanólico de romero mostró un efecto espasmolítico significativo y dependiente de la dosis en cobayo de experimentación ileum, mediado a través del doble bloqueo de los receptores muscarínicos y los canales de calcio. no hubo evidencia de la participación de receptores nicotínicos, prostaglandinas u óxido nítrico con esta actividad (Ventura-Martinez *et al.* 2011)²³.

2.2.8. Actividad antiviral.

Se ha demostrado que el extracto etanólico de Romero y el ácido carnosólico inhiben el virus del herpes simple tipo 2 y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), respectivamente (pharmaceutical Press Editorial Team 2013)²³.

2.2.9. Propiedades antidepresivas.

Se ha demostrado que el tratamiento crónico con 10 mg / kg de extracto hidroalcohólico de Romero produce efectos antidepresivos en roedores, similares a los producidos por la fluoxetina (Prozac). El extracto de Romero, como la fluoxetina, redujo la actividad de la acetilcolina (Machado *et al.*, 2012). Los componentes polifenólicos del romero (luteolina, ácido carnósico y ácido rosmarínico) también han demostrado que modulan el ácido dopaminérgico, serotoninérgico y aminobutírico (GABA) - vías ergicas (Sasaki *et al.* 2013)²³.

2.2.10. Contraindicaciones.

Hipersensibilidad al romero. La seguridad del romero durante el embarazo es incierta. Informes anteriores describen el uso de romero (posiblemente el aceite) como abortivo, aunque los estudios en animales no han indicado tal actividad para extractos acuosos. También se informa que el romero es un emenagogo (afecta el ciclo menstrual), por lo que durante el embarazo y la lactancia deben evitarse cantidades superiores a las que se encuentran en la ingesta normal de alimentos. los epilépticos deben evitar altas dosis de romero debido al potencial del constituyente alcanfor puede causar convulsiones (EMA 2010, Gardner y McGuffin 2013, pharmaceutical Press Editorial Team 2013)²³.

2.2.11. Efecto adverso.

Reacciones alérgica que incluyen eritema y dermatitis, confirmadas por productos que contienen romero. La fotosensibilidad se ha asociado con el aceite de Rosemary. El carnosol se identificó como el alérgeno principal en un caso de dermatitis de contacto ocupacional (Gardner y Mc guffin 2013, Pharmaceutical Press Editorial Team 2013)²³.

2.2.12. Efectos sobre la cognición.

Un estudio cruzado aleatorizado, doble ciego, a corto plazo y cruzado controlado investigó los efectos agudos de diferentes dosis de poder de la hoja de romero sobre la función cognitiva en 28 adultos mayores (edad promedio de 75 años). El sistema de evaluación computarizado de investigación cognitiva del fármaco se usó a intervalos de hasta 6 horas después de la administración oral de cuatro dosis diferentes de Romero (750, 1500, 3000, 6000 mg) y placebo. Las dosis se contrarrestaron, con un período de lavado de 7 días entre tratamientos, distribuidos durante 5 semanas. Los resultados demostraron un efecto bifásico dependiente de la dosis en la velocidad de la memoria: la dosis más baja de (750 mg) tuvo un efecto beneficioso significativo en comparación con el placebo ($p = 0,01$). Mientras que la dosis más alta (6000 mg) tuvo un efecto perjudicial significativo ($p = 0,01$). Varias dosis de Romero exhibieron efectos nocivos sobre otras medidas del rendimiento cognitivo, pero estas fueron inconsistentes y no dependientes de la dosis (Pengelly *et al* 2012). Dado el estudio a pequeña escala y los efectos variados de diferentes dosis de Romero, no es posible dilucidar conclusiones firmes en cuanto a la eficacia del Romero en la mejora de la memoria, y se requiere más investigación²³.

Condiciones cardiovasculares. Mejora la circulación aumenta la presión arterial y estimula el corazón débil sujeto a palpitaciones cuando se consume en pequeñas dosis¹⁹.

Sistemas circulatorios gastrointestinales. En condiciones de mal aliento y malestar estomacal. Promueve adecuadamente digestión, tonificación y efecto calmante sobre la digestión¹⁹.

Condiciones del hígado Promueve la función hepática, promueve la producción de bilis¹⁹.

En aromaterapia, el aceite esencial se usa como descongestivo, como inhalante, por agotamiento, por dolores de cabeza, para mejorar la memoria y limpiar la concentración¹⁹.

El aceite se usa en aceites / lociones para la artritis, moretones, eczema, gota, dolor muscular, neuralgia, revitalizante extremidades paralizadas, reumatismo, artritis reumatoide, ciática, llagas escrofulosas, heridas y frotarse en el cabello para estimular las bombillas de cabello a la actividad renovada y para prevenir la calvicie¹⁹.

La esencia tiene actividad fungicidas, antisépticas, antibacteriana y balsámica empleado para tratamientos de afecciones respiratorias. Además tiene actividad cicatrizante y rubefaciente¹⁹.

2.2.13. Uso tradicional de *Rosmarinus officinalis* (Romero) en odontología.

Indicación: Queilitis angular, estomatitis aftosa (aftas), tónico peludo negro, bruxismo, candidiasis (aftas), caries, quistes / tumores, llagas en la dentadura, que aumentan la integridad capilar, molestias gastrointestinales, gingivitis, glositis, enfermedad de las encías, halitosis (mal aliento), herpes, HPV, alteración de la circulación, infección, inflamación, metanfetamina, NUG / enfermedad de Vincent, pénfigo vulgar, pericoronitis, periodontitis, placa, sinusitis, estrés, tensión, trastornos de la ATM, lavado / parte de un enjuague bucal para la extracción posterior / escala / llenado / ajuste / ajuste protésico²⁴.

La actividad antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* contra patógenos orales realizado en la Universidad de Purca resalta la relevancia del ácido carnósico y carnosol. La relevancia del ácido carnósico y los nuevos hallazgos de carnosol en la química y la biodiversidad. "la actividad inhibidora in vitro de extractos crudos de ETOH / H₂O de las hojas y tallos de *Rosmarinus officinalis* L. se evaluó contra los siguientes microorganismos responsables de iniciar la caries dental: *Streptococcus mutans*, *estreptococo salival*, *estreptococo sobrinus*, *Streptococcus mitis* *Streptococcus sanguinis* y *Enterococo fecalis*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) se determinaron con el método de microdilución en caldo ", escribieron los científicos en el informe de química y biodiversidad. El fraccionamiento con el HPLC de los metabolitos fueron el ácido carnosico y carnosol presentan actividad bacteriana en cambio el ácido rosmarínico, ácido oleanólico y ursólico no presentan actividad²⁵. (ANEXO 4)

El análisis por HPLC de **2** mostró que sus compuestos principales son los ácidos carnosico t_R 32,16 minutos y para el carnosol fue t_R 27,41 minutos. En cuanto a su actividad antimicrobiana, tanto **2** como **3** mostraron efectos inhibitorios significativos contra los patógenos orales. Exhibieron una mejor actividad antibacteriana que el timol, un agente antibacteriano comercialmente disponible, que se usó como control positivo²⁵.

La literatura informa escasa información sobre las actividades antimicrobianas de *Rosmarinus officinalis*, y la mayoría de este trabajo se refiere a su aceite esencial. En una reciente evaluación antimicrobiana in vitro de formulaciones comerciales de extracto de Romero contra algunas bacterias mostraron que las bacterias Gram-positivas eran más sensibles a las formulaciones que los Gram-negativos, especialmente en el caso de extractos solubles en aceite que contienen ácido carnósico como el principal compuesto fenólicos. Por otra parte, un estudio reciente también demostraron las actividades antimicrobianas del extracto de hoja de *Rosmarinus officinalis* así como de ácido carnósico contra bacterias y levaduras con relevancia dermatológica²⁵.

Por otro lado, el ácido rosmarínico (t_R 7,47 min), que se detectó como principal compuesto en el Padre. **1** no mostró actividad antimicrobiana contra la prueba oral patógenos. Además, los derivados de éster de acetilo y metilo, **1a** y **1b**, respectivamente, preparados a partir de **1** no fueron capaces de mejorar su actividad inhibidora²⁵.

El análisis de HPLC también mostró que tanto el ácido ursólico (4) como el ácido oleanólico (5) están presente en pequeñas concentraciones en Frs. 2 y 3 del HEROL. Relativa a la actividad antibacteriana de estos ácidos triterpénicos, estudios previos realizados en nuestro laboratorio reveló que tanto 4 como 5 poseen actividad moderada contra patógenos orales²⁵.

Las actividades antibacterianas de los dos extractos y los compuestos aislados contra los patógenos orales seleccionados también se compararon con clorhexidina, un antiséptico que posee varios efectos secundarios perjudiciales. La alta actividad bactericida de La clorhexidina se debe a su capacidad para inhibir las actividades glicosídicas y proteolíticas. Además, es capaz de reducir las actividades de metaloproteinasas de la matriz en una gran variedad de bacterias orales²⁵.

Varios compuestos fenólicos, como timol, han sido reportados para su inhibición de bacterias orales. Se demostró que el resto OH unido al se requiere anillo aromático para la alta actividad antibacteriana de este tipo de compuestos. Sin embargo, se observó que el ácido rosmarínico, que es un polifenólico compuesto, no mostró actividad antibacteriana contra los patógenos orales seleccionados. Además, se ha informado que algunos compuestos polifenólicos presentes en el té los extractos poseen baja actividad anticariogénica contra los patógenos orales. Por lo tanto, la aparición de grupos fenol puede no ser la única característica química esencial para la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos¹⁵.

2.2.14. Caries dental

2.2.15. Etiología

W. Miller en 1882 planteo la etiopatogenia de la caries; consideraba lo más importante la cantidad de la bacteria que producían el ácidos al metabolizar los carbohidratos de la dieta, demostró su hipótesis aislando los grupos de bacterias cariogenicos. Por parte Keyes propuso que la caries es una enfermedad multifactorial para el cual es necesario 3 factores: diente como hospedero, el sustrato y la microflora. Luego en 1988 New Brun añadió el factor²⁶.

En la cardiología moderna se consideran relativos al huésped algunos factores socioeconómicos y culturales, los cuales intervienen en el desarrollo etiopatogenia de la caries donde la dieta e higiene oral regulan la respuesta inmune oral en relación a la saliva fluido crevicular²⁶.

La caries se produce por una serie de acontecimientos que se combinan para su desarrollo, entre estos están:

1. Deficiente o nula higiene oral (cepillado con dentífrico y uso de hilo dental) tanto en frecuencia y técnica.
2. Ingesta de alimentos ricos en carbohidratos sobre todo refinados.
3. Placa dentobacteriana
4. El tiempo de exposición a la placa dentobacteriana.

La descomposición del tejido dentario es a nivel por un proceso bacteriano y histoquímico que finaliza con la descalcificación y disolución de los compuestos inorgánicos y de la matriz orgánica²⁶.

La caries se inicia con una lesión de aspecto tizoso o mancha blanca sobre la superficie del esmalte; de no ser remineralizado la lesión puede conllevar a la formación de cavidades cariadas, que luego de la lesión del esmalte pasara a la dentina y continuar hasta la pulpa. Según menciona Gonzalez Sanz, *et al*²⁶.

2.2.16. El *Streptococcus mutans* y sus factores de virulencia

Los factores de virulencia del *Streptococcus mutans* asociado al la caries dental son:

1. **La acidogenicidad:** El *Streptococcus mutans* fermenta los azúcares de los restos de la dieta produciendo ácido láctico como producto final. Esto conlleva que baje el pH ocasionando que se desmineralice el esmalte de los dientes.
2. **Aciduricidad:** El *Streptococcus mutans* tiene la capacidad de producir ácido en un medio pH bajo.
3. **Acidofilicidad:** El *Streptococcus mutans* a resistir la acidez del medio liberando protones (H⁺) fuera de la célula.
4. **Síntesis de glucanos y fructanos:** las enzimas fructosiltransferasas FTF y glucosiltransferasa GTF, estos a partir de la sacarosa producen glucano y fructano, donde los glucanos son usados como reserva de

nutrientes, son insolubles y ayudan a la adherencia bacteriana al diente.

La GTF por medio de hidrólisis a dos moléculas de sacarosa lo disocia en sus monosacáridos la α -D-glucosa y β -D-fructuosa. Las moléculas de glucosa resultantes son polimerizadas por enlaces α (1-6), α (1-4) o α (1-3) y estos forman los glucanos extracelulares bacterianos con liberación de dos moléculas de fructuosa.

De acuerdo con las características de solubilidad de su producto, las GTF se clasifican en: agua y GTF-s sintetizan dextrano, un glucano que posee uniones lineales, (1-6), es soluble en agua y aspecto globular, GTF-I sintetiza un glucano insoluble y fibrilar con predominio de uniones α (1-3) y la GTF-SI, sintetiza ambos tipos de glucanos.

El *Streptococcus mutans* secreta los tres tipos de GTF. Al producto de la GTF –I Y GTF-SI, con predominio α (1-3), se denomina mutano. Su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar lo involucra en los fenómenos de adherencia, agregación y acumulación bacteriana en la placa dental. De esta manera la capacidad de producir mutano se relaciona con la cariogénesis del *Streptococcus mutans*.

5. Producción de dextranasa.

Las bacterias tienen la posibilidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como la dextranasa y mutanasa. Estas se disponen en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, hidrolizan y facilitan así el paso de los productos de la misma.

Las bacterias utilizan a los glucanos extracelulares como fuente de energía y de reserva²⁶.

2.2.17. Factores locales que afectan la incidencia de caries

Los factores que interactúan en la caries dental que están relacionados son la dieta, el huésped y la flora microbiana interactúan de la misma manera que aumenta la desmineralización de la estructura dental con el resultado formación de caries.

Algunas razas tienen una mayor incidencia de caries dental, por ejemplo, el americano blanco y el inglés. Algunas razas (por ejemplo, los indios y los Afroamericanos debido a patrones hereditarios tienen una menor incidencia de caries dental. Hay algunos factores locales que pueden alterar fácilmente la manifestación de la actividad de la caries en función del patrón de herencia.

En la década de 1960, Keyes demostró que existen tres factores previos relacionados con la evolución de la caries dental, conocida como la tríada de Keyes. los factores son la placa, el diente y la dieta. Más tarde se llevaron a cabo muchos estudios que modifico el modelo de Keyes.

La diferencia en la ocurrencia de caries dental en personas diferentes de la misma edad, sexo, raza y área geográfica, dieta y condiciones de vida similares se debe a varios factores que manipulan la etiología de la caries.

1. Diente (hospedero)
 - Variación en morfología
 - Composición
 - Posición
2. Sustrato (factor ambiental)
 - Saliva
 - I. Composición
 - II. cantidad
 - III. pH
 - IV. viscosidad
 - V. Factores antibacterianos.
 - Dieta
 - I. Factores físicos
 - II. Factores locales
 - a. Contenido de carbohidratos: Presencia de partículas de carbohidrato cariogénicos refinados en la superficie del diente.
 - b. Contenido de vitamina
 - c. Contenido de flúor
 - d. Contenido grasa
3. Microorganismos: Los microorganismos más comúnmente asociados con caries son *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.
4. El período tiempo²⁷.

(ANEXOS 5-7)

2.2.18. Adquisición temprana de *Streptococcus mutans* y caries dental

La caries dental es considerada como una enfermedad de transmisión multifactorial que aproximadamente el 90% de la población global presenta, numerosas investigaciones resaltan que el principal factor es la mala salud bucal de los padres que influirá en la adquisición temprana de la caries, porque ellos son los trasmisores de *Streptococcus mutans*. Por esta razón los padres que tienen caries sus hijos tienen un alto riesgo de adquirir tempranamente la enfermedad²⁸.

La caries es una enfermedad crónica que afecta tanto a niños como adultos a nivel mundial. Donde los más susceptibles son los menores de tres años de edad, por la colonización temprana de la bacteria *Streptococcus mutans* que es el causante de la caries.²⁸.

La forma de transmisión de la bacteria *Streptococcus mutans* en los primeros años de vida es vertical y se producen por contacto directo de madre a hijo. Por otra parte la transmisión horizontal está dada por el contacto con otros miembros de la familia como el padre, los hermanos, abuelos y cuidadores; que cobra importancia durante edades posteriores. Mientras más temprana sea la colonización de *Streptococcus mutans*, mayor es el riesgo de caries futuras. Autores de diversas investigaciones especularon que al menos en los niños muy pequeños, la presencia de placa dental visual en los incisivos superiores puede ser indicativo de niveles elevados de *Streptococcus mutans*. Por lo tanto, es importante determinar el momento inicial de transmisión y

colonización de *Streptococcus mutans* con miras a planear estrategias preventivas apropiadas para cada individuo coherentes con su edad²⁸.

2.2.19. Formación de la placa dental

La formación de la placa dental viene a ser el resultado de una serie de complejos procesos que involucran una variedad de componentes bacterianos y de la cavidad bucal del huésped. Estos procesos son los siguientes²⁹:

Formación de la película adquirida

La superficie dentaria no se encuentra en contacto directo con la cavidad bucal. Inmediatamente después de cepillar un diente, comienzan a depositarse sobre su superficie, proteínas de origen salival y del fluido crevicular, por un proceso de absorción altamente selectivo y específico formándose como resultado una película acelular que varía de grosor entre 0,1 y 3 micrómetros con un alto contenido de grupo carboxilos y sulfatos que incrementan la carga negativa neta del esmalte²⁹.

En el proceso de formación de la película, son incorporadas a su superficie una serie de componentes de origen salival tales como enzimas Lisozima, Peroxidasa y Amilasa, que pueden influenciar la colonización bacteriana sobre la película. Igualmente son incorporadas enzimas como la Glucosiltransferasa (GTF), e inmunoglobulinas²⁹.

2.2.20. Colonización por microorganismos específicos

Luego de formada la película adquirida, esta comienza a ser colonizada por microorganismos residentes de la cavidad bucal. Este proceso ha sido dividido en cuatro etapas²⁹.

Deposición

Fase reversible en la que se produce un acercamiento inicial de las bacterias a la superficie de la película.

Adhesión

Fase irreversible en la que participan componentes tanto de la bacteria como del huésped, los cuales, juegan un papel muy importante en la unión de los microorganismos a la película salival. La presencia de estos componentes determina que se produzcan uniones químicas o físicas entre los constituyentes bacterianos y de los huéspedes²⁹.

Algunos de los mecanismos propuestos para la adherencia son²⁹:

- a. A través de las adhesinas.
- b. Otro modo de adherencia es a través de puentes de Calcio y magnesio (++) entre los componentes bacterianos de carga (-) como los ácido lipoteicoico y teicoico, los componentes cargados negativamente de la película adquirida.

- c. Otra forma es por medio de polisacáridos extracelulares como el glucano y enzimas GTF producidas por bacterias sacarolíticos como el *Streptococcus mutans*.
- d. También a través de fimbrias.

2.2.21. Clasificación de *Streptococcus mutans*

Con base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, *Streptococcus* del grupo *mutans* se pueden clasificar en 8 serotipos: *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k), *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *Streptococcus rattus* (serotipo b), *Streptococcus ferus* (serotipo c), *Streptococcus macacae* (serotipo c) y *Streptococcus downei* (serotipo h). Se sabe que el serotipo c de *Streptococcus mutans* es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, f y k³⁰.

Streptococcus mutans

El más común y principal responsable de iniciar este proceso de colonización es el *Streptococcus mutans*, coco Gram positivo, anaerobio facultativo, acidogénico, acidofílico y cuya pared celular presenta adhesinas que sirve para que se adhieren a través de sus receptores específicos a la película adquirida de la saliva³⁰.

2.2.22. Método de selección de la muestra:

Obtención de la cepa *Streptococcus mutans*

En este estudio se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, el cual se obtuvo del Laboratorio GenLab del Perú SAC en su forma liofilizado. Luego fue cultivado para la obtención de bacterias jóvenes que fueron utilizados para la parte experimental en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener conducidos por la asesora y el microbiólogo.

Preparación de la Cepa:

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, primero se activó en el recipiente polvo líquido hasta homogenizar luego se procedió al sembrado con su hisopo en forma de estrías en dos placas con Agar Mueller Hilton - sangre. Se incubarán bajo condiciones de microanaerobiosis (método de la vela) a 36°C en la jarra de Gaspack con el fin de obtener colonias jóvenes. Luego de 48 horas se obtuvieron cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 jóvenes, luego se procedió a preparar el inóculo hasta alcanzar una turbidez semejante al tubo número 05 de la escala de Mac Farland. Se utilizó la escala de Duraffourd para la interpretación de los halos inhibición³¹.

2.2.23. Clorhexidina

La clorhexidina (CHX) es un agente antimicrobiano mejor estudiado y mas efectivo utilizado en odontología; se trata de una bisbiguanida catiónica con propiedades hidrofílicas y hidrófobas. Su modo de acción consiste en la alteración de la membrana microbiana al interactuar con la parte hidrofóbica de la molécula. La molécula cargada positivamente también se une a los grupos cargados negativamente en la mucosa bucal, lo que resulta en una alta sustantividad del antimicrobiano³².

Mientras que la clorhexidina se utiliza principalmente en forma de enjuagues bucales para el tratamiento periodontal, en la terapia de caries es mas común la aplicación local, estos barnices no muestra los efectos secundarios habituales de los enjuagues bucales de CHX, como pigmentación de los dientes; descamación epitelial y la lengua vellosa³². (ANEXOS 8 y 9)

2.2.24. Características

La clorhexidina es un agente antimicrobiano. Actúa en el interior membrana citoplásmica. Es molécula dicationica con un pH superior a 3,5. Previene la acumulación de placa, por lo tanto, es una antiplaca, agente antigingivitis y reduce la adherencia de *Porphyromonas gingivalis* sobre las células epiteliales. CHX es bacteriostático o bactericida dependiendo de la dosis. Tiene amplio espectro sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, dermatofitos y virus lipolíticos. También actúa contra hongos, levaduras y algunos virus incluyendo Virus de Hepatitis B y HIV. Eso actúa contra los

mutantes de *Streptococcus mutans* por lo que es anticariogénica de naturaleza. Los estudios también han demostrado que la clorhexidina tiene la capacidad de neutralizar agentes patógenos como *Streptococcus aureus*, *Porphyromans gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Otra propiedad única más importante de la clorhexidina es su sustentividad: La sustentividad se refiere a la retención oral. Depende de varios factores como concentración, pH, temperatura y tiempo de contacto de la solución con la estructura oral³³.

En la década de los cuarenta desarrollaron los antimalaricos, realizaron formulaciones llamados polibisguanidas, los cuales tienen amplio espectro antimicrobiano. El más importante es la Clorhexidina el cual es usado como antiplacas³⁴.

En la década de los setenta se empezó su uso como los enjuagues bucales de clorhexidina en la flora oral humana en periodoncia. Donde se demostró que el número de bacterias por mL de saliva fue reducido en 85 % después de 24 horas y durante el periodo experimental estuvo entre 85 a 90% de efectividad con el uso de gluconato de clorhexidina al 0,2% 10 mL dos veces al día cada uno durante 1 minuto este ayuda a prevenir la formación de placa dental y el desarrollo de la gingivitis.(Löe y Schiott). Según Altannir y col. en 1994 la clorhexidina es de uso corriente en más de noventa países y que más diez mil millones de aplicaciones de gluconato de clorhexidina han sido llevadas a cabo en los dos últimos años³⁴.

2.2.25. Mecanismos de acción.

Clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8 -12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo³⁴. (ANEXO 10)

2.2.26. Espectro de acción de CHX.

Clorhexidina tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Es activa frente a un amplio rango de organismos Gram + y Gram - así como sobre hongos. Estos microorganismos no tienen el mismo grado de sensibilidad a clorhexidina. Por ejemplo los microorganismos Gram + son más sensibles que los Gram-, mientras que los estreptococos son más sensibles que los estafilococos³⁴.

2.2.27. Concentración.

La clorhexidina suele presentarse en tres concentraciones, al 0,05, 0,12 y 0,2 %, se recomienda realizar un buche con 10 mL de producto a una concentración del 0,2 % y de 15 mL al 0,12 %, esto es debido a la dosis total de clorhexidina ya que 10 mL al 0,2 % libera 20 mg y 15 mL al 0,12 % libera 18 mg, observándose que los resultados con ambas formulaciones son igual de efectivos³⁴.

2.2.28. Cloruro de Cetilpiridinio (CPC).

CPC es un compuesto de amonio cuaternario catiónico con propiedades tensioactivas y un amplio espectro antimicrobiano sobre patógenos grampositivos y levaduras; tiene efecto sobre la placa y la gingivitis. CPC menos sustentividad y actividad que la CHX, pero cuando ambos se combinan tienen un efecto sinérgico sobre la bacteria⁸.

2.3. Terminología básica

Termino	Significado
MIC	Concentración mínima inhibitoria (MIC), es la acción de un bactericida sobre los microorganismos que actúa inhibiendo su crecimiento después de su incubación ¹⁶ .
<i>Streptococcus mutans</i>	Bacteria Gram positiva, acidofílico, anaerobio facultativo, forma parte del biofilm y causante de la caries dental ²⁸ .
Clorhexidina	Antiséptico con propiedades bactericidas y bacteriostáticas de amplio espectro de acción, dependiendo de su concentración ³² .
Caries	La caries dental es una enfermedad de tipo multifactorial que se inicia por la desmineralización de los ácidos de las bacterias y la acción de <i>Streptococcus mutans</i> con la destrucción del esmalte, dentina y pulpa ²⁶ .

Extracto	Es una sustancia obtenida de la extracción de una materia prima usando agua ó solvente que luego serán usados en forma líquida, tinturas, extractos o polvo ²¹ .
Halo de inhibición	Zona libre de crecimiento bacteriano alrededor de disco de sensibilidad de antibiogramas en una placa de agar que sirve para medir el potencial del antibiótico ⁴ .
In vitro	Experimentación de la sensibilidad de un tratamiento con antibiótico a nivel de laboratorio antes de pasar a hacer tratamiento in vivo (persona o animal) ⁴ .
Agar Mueller Hilton	Es un medio de cultivo no selectivo para el cultivo y aislamiento de microorganismos, pero cuando se le enriquece con sangre de carnero al 5% permite realizar pruebas de sensibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> ¹⁶ .
Escala de Duraffourd	Escala para realizar mediciones de los halos de inhibición de los extractos in vitro ⁴ .
Digluconato de CHX	El Digluconato de CHX (C ₃₄ H ₅₄ Cl ₂ N ₁₀ S ₁₄) es la forma más estable es de sal, el cual presenta una alta solubilidad en agua y es una molécula simétrica con dos anillos 4 clorofenil y dos grupos Bisguanidas enlazadas por una cadena central de hexametileno ^{8,33} .

2.4. Hipótesis

2.4.1. General

El efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) es mayor que del Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 estudio comparativo in vitro.

2,4.2. Específicos:

1. El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% poseerá efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. El Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% tendrá efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2.5. Variables e indicadores

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICION	VALOR
Extracto etanólico sustancias experimentales <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) (Variable Independiente)	Cualitativa	Sustancias experimentales (Digluconato de clorhexidina 0.05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,12%) (Variable independiente)	Nominal	Extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) 25% Extractos etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) 50%. Extractos etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) 100%.
Efecto antimicrobiano Sobre el <i>Streptococcus mutans</i> (Variable Dependiente)	Cuantitativa continua	Tamaño del halo de inhibición formado alrededor del disco	Razón	mm (Escala de Duraffourd)

CAPITULO III: DISEÑO Y METODO

3.1. Tipo y nivel de investigación.

Experimental in vitro: Porque se valora el efecto de una o más variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.

Prospectivo: Porque los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo en el futuro.

Transversal: se estudian las variables en determinado momento haciendo un corte en el tiempo del cual se toma la información que será utilizada.

3.2. Ámbito de Investigación

Laboratorios de investigación y microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener.

3.3. Población y muestra

La muestra estuvo formada por una colección de unidades experimentales, cada unidad experimental estará constituida por una placa cultivada con *Streptococcus mutans* ATCC 25175. En el presente trabajo al ser un diseño de tipo experimental in vitro se compararán los promedios de diámetro de los halos de inhibición se utilizará la siguiente ecuación para determinar el tamaño de muestra correspondiente a un muestreo aleatorio simple:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha} = 1,96$ Es una constante de la distribución Normal usada para que la estimación tenga un error tipo I del 5% (error tipo I: Rechazar H_0 cuando esta es verdadera) lo que se traduce en un nivel de seguridad o confianza del 95%

$Z_{\beta} = 1,64$ Es una constante de la distribución Normal usada para que el error tipo II sea del 10% (error tipo II: Aceptar H_0 cuando esta es falsa) en consecuencia la potencia de la prueba sea del 90%

$S = 0,82$ mm, Es la desviación estándar máxima esperada obtenida de Marín G (2016)⁶.

$d = 0,90$ mm es la diferencia entre tratamientos que queremos detectar (precisión de las estimaciones de las diferencias)

Reemplazando tenemos:

$$n = \frac{2(1.96 + 1.64)^2 0.82^2}{0.90^2} = 17$$

Además de esto se considerará una proporción de pérdidas (p_e) del 12%, con lo cual tenemos:

$$n_c = \frac{n}{1 - p_e}$$

Con $p_e = 0,12$

Reemplazando se obtiene:

$$n_c = \frac{17}{1 - 0.12} = 20$$

Luego el tamaño de la muestra que garantiza detectar diferencias de 0.90 con un nivel de significancia de 0,05 y un porcentaje de pérdidas del 12% es de 20 unidades experimentales por cada concentración⁶.

La muestra total estar constituida de 126 unidades experimentales.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

En la presente investigación se utilizó de técnica del antibiograma de difusión en discos de la técnica de Kirby – Bauer. Y también se presentó una ficha para en llenado de datos. (ANEXO 11)

Extracción del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero)

El Romero es procedente del Departamento de Ancash, provincia de Huaraz a una altura de 3,052 msnm. La planta fue clasificada taxonómicamente en el herbario de museo de historia natural de la UNMSM. La planta recolectada fue tallo con sus hojas, luego se seleccionó, lavo con agua destilada, seco, desajo y se procedió a pesar 500 g. Para luego secar en la estufa a 40 °C por 72 horas. Una vez seca las hoja se trituro en un mortero y después se llenó en un frasco de vidrio, se le añadió 1 L de alcohol etanol de 70° y después dejamos macerar por 7 días y agitándolo todo los días. El extracto etanólico fue filtrado 3 veces. Se procedió a verter el extracto en un envasé de vidrio y dejado en la campana de flujo laminar para la eliminación el solvente

por tres días, luego se llevó a la estufa a 37 °C por una semana. Al final se obtuvo un extracto seco de 17,43 g. Para la parte experimental se prepararon los extractos para su uso inmediato en las concentraciones de 0,25, 0,50 mg/mL y 1 g/mL. (ANEXO 12)

Método de selección de la muestra y Preparación de la Cepa:
***Streptococcus mutans* ATCC 25175**

La determinación de la susceptibilidad (Efecto antibacteriano) se realizó con la preparación del cultivo con el hisopo propio embebido con la cepa combinado en su cartucho previamente. Luego a una distancia de 10 cm de la llama del mechero, se procedió al sembrado en placas Petri conteniendo Agar Mueller Hinton - Sangre, el sembrado se realizó en estrías con el hisopo uniformemente sobre toda la superficie de agar, girando cada placa 30 grados 10 veces aproximadamente. Las placas recién sembradas fueron incubadas en condiciones de microanaerobiosis a de 36 a 37°C en atmósfera con 5% - 10% de CO₂ durante 48 horas. Para el efecto antibacteriano se utilizó la técnica de difusión de discos de Kirby y Bauer, la cual consiste en preparar los discos de papel de filtros estériles de un diámetro de 4 mm y esterilizados para luego ser colocados con la pinza estéril en la superficie de las placas preparadas previamente agar Mueller Hinton-sangre (5 mL de sangre x 100 mL de Agar Mueller Hinton) al cual se le añadió el inóculo de *Streptococcus mutans* preparada en suelo fisiológico estéril con una turbidez 5 de acuerdo a la escala de Mac Farland. Se colocaron 7 discos por placa al cual se le aplico 10 µl de las soluciones (extracto, Digluconato de clorhexidina y agua

bidestilada), se dejó en reposo en la misma posición por 5 minutos. Luego de este tiempo las placas se voltearon de posición, luego incubaron por 48 horas en microanaerobiosis utilizando la jarra Gaspack, con el método de vela, mediante el cual se genera un ambiente aproximado de 5 a 10% de CO₂. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama al mechero. La lectura de los resultados se llevó a cabo después de las 48 horas, mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuaron las mediciones de los halos de inhibición que generaron las soluciones de estudio sobre *Streptococcus mutans* ATCC 20175, se utilizó el Vernier para hacer las mediciones.

3.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los resultados de las mediciones hechas en laboratorio se registraron en una hoja de Excel V. 2016 luego se exportó al SPSS V. 24 para el análisis estadístico.

Para la prueba de hipótesis se aplicó la prueba de ANOVA o en el caso de detectar varianzas no homogéneas se aplicó el Test de Kruskal Wallis, luego se realizaron las comparaciones múltiples para determinar si existen diferencias entre pares de tratamientos.

Además, se calculó la estadística descriptiva: Media, Desviación estándar, valores extremos, se estimó los promedios mediante intervalos de confianza.

En la parte estadística use el Excel Versión 2016 para realizar los gráficos debido a su versatilidad y facilidad de edición. Finalmente, los resultados fueron editados en Word Versión 2016.

3.6. Aspectos éticos

Los desechos de las muestras del presente estudio se descartó de acuerdo a las normas: INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica) código: 15. (Anexo. 13).

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados

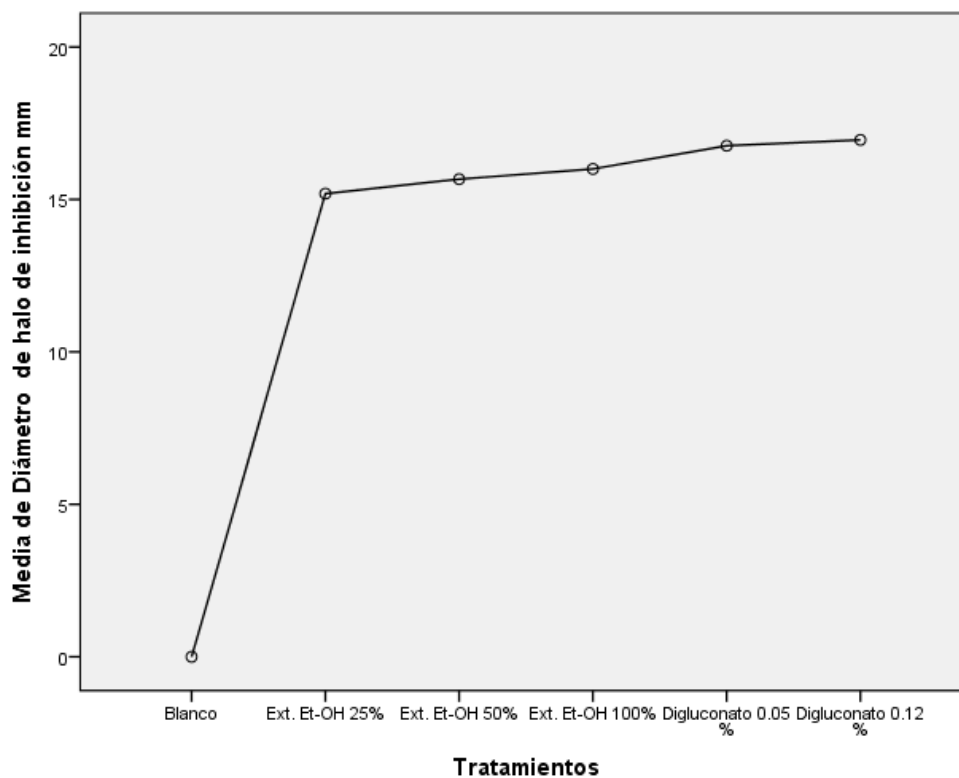
Tabla 01: Estadísticas descriptivas del diámetro de halo de inhibición mm

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Blanco	21	0.00	0.00	0	0
Ext. Et-OH 25%	21	15.19	0.81	14	16
Ext. Et-OH 50%	21	15.67	0.48	15	16
Ext. Et-OH 100%	21	16.00	1.34	14	18
Digluconato 0.05 %	21	16.76	0.83	15	18
Digluconato 0.12 %	21	16.95	0.87	16	18

La tabla 01: Muestra los diámetros de halos de inhibición, se observa que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* a la concentración de 100% presenta un diámetro promedio de 16,00 mm, seguido del extracto al 50% con 15,67 mm y el extracto al 25% con 15,19 mm. Los controles positivos de Digluconato de CHX 0,05 y 0,12% más Cloruro de Cetilpiridinio 0,05 tuvieron un promedio de 16,76 mm y 16,95 mm.

(ANEXOS 14 y 15)

Además al observar la desviación estándar observamos que el extracto al 100% de concentración presenta una mayor desviación ($s=1,34$) mientras que el extracto a 50% de concentración presenta por el contrario una mayor homogeneidad en sus resultados ($s=0,48$), a la misma conclusión se llega al observar los valores máximo y mínimo. En el caso de la desviación fueron ($s= 0,83$ y $1,04$).



Grafica 01: Grafica de medias del diámetro de halo de inhibición mm *Rosmarinus officinalis* (Romero) EtOH 25, 50 y 100% (0,25, 0,50 mg/mL y 1g/mL)

La figura 01 muestra el valor promedio de los diámetros de los halos de inhibición, notamos que al aumentar la concentración aumenta el efecto de inhibición del extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* (Romero).

Tabla 02: Pruebas de normalidad diámetro de halo de inhibición mm

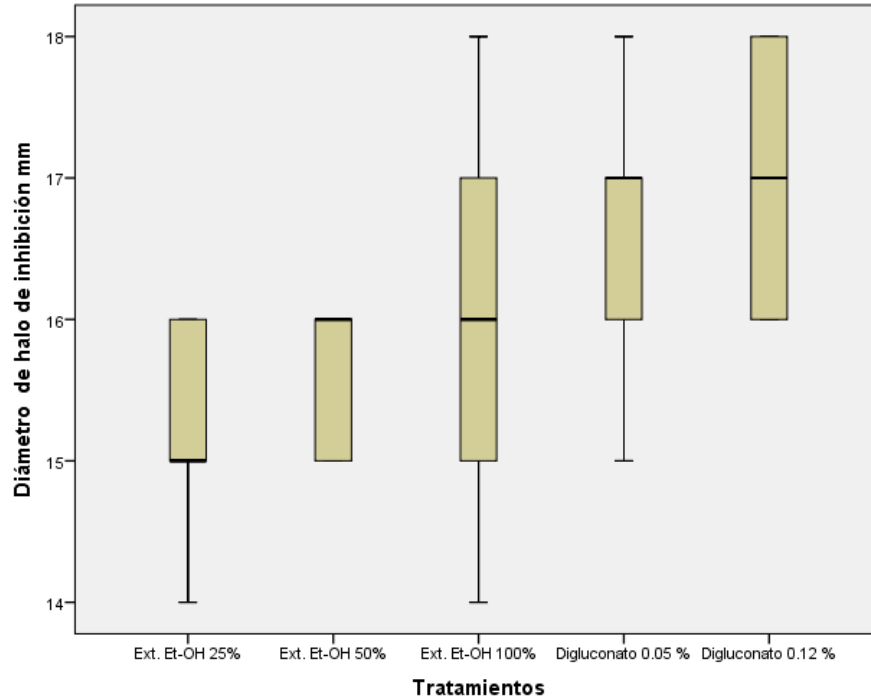
Tratamientos		Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	p valor	Estadístico	gl	p valor
Diámetro de halo de inhibición mm	Ext. Et-OH 25%	.269	21	.000	.788	21	.000
	Ext. Et-OH 50%	.422	21	.000	.599	21	.000
	Ext. Et-OH 100%	.214	21	.013	.864	21	.008
	Digluconato 0.05 %	.327	21	.000	.833	21	.002
	Digluconato 0.12 %	.246	21	.002	.784	21	.000

La tabla 02 presenta la prueba de normalidad para los diámetros de los halos de inhibición: Ext. EtOH y el Digluconato de CHX en las diferentes concentraciones.

Ho: El Diámetro de halo de inhibición presenta distribución normal.

H1: El Diámetro de halo de inhibición no presenta distribución normal.

Como el p valor tanto de la prueba de Kolmogorov-Smirnovb y Shapiro-Wilk presentan un p valor menor a 0,05 por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se concluye que el diámetro de los halos de inhibición no presenta distribución normal, por lo tanto, no podemos aplicar la prueba ANOVA y en su lugar usaremos una prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal Wallis)



Grafica 02: Diagrama de cajas del diámetro de halo de inhibición mm.

La grafica 02 muestra los valores medianos de los diámetros de halos de inhibición para cada tratamiento, al observar que la amplitud de las cajas son diferentes se evidencia los problemas con la homogeneidad de las varianzas lo cual refuerza el uso de pruebas no paramétricas.

Tabla 03: Prueba de Kruskal Wallis

	Diámetro de halo de inhibición mm
Chi-cuadrado	82.015
gl	5
p valor	.000

La tabla 03 presenta la prueba de Kruskal Wallis:

Ho: No existe efecto inhibitorio.

H1: Al menos existe un grupo que presenta efecto inhibitorio.

Como el p valor es < a 0,05 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 usaremos el método de comparaciones múltiples.

Tabla 04: Comparaciones múltiples Games-Howell

(I) Tratamientos		Diferencia de medias (I-J)	p valor
Blanco	Ext. Et-OH 25%	-15,190*	.000
	Ext. Et-OH 50%	-15,667*	.000
	Ext. Et-OH 100%	-16,952*	.000
Digluconato 0.05 %	Ext. Et-OH 25%	1,571*	.000
	Ext. Et-OH 50%	1,095*	.000
	Ext. Et-OH 100%	.762	.259
Digluconato 0.12 %	Ext. Et-OH 25%	1,762*	.000
	Ext. Et-OH 50%	1,286*	.000
	Ext. Et-OH 100%	0,952	.094

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

La tabla 04 compara en primer lugar nuestros tres extractos con el grupo blanco, debido a que el p valor es menor a 0,05 se concluye que los tres extractos presentan un efecto inhibitorio.

En segundo lugar, comparamos el Digluconato de CHX 0,05% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% con cada uno de nuestros tres extractos, en este caso el p valor para los extractos al 25 y 50% son menores a 0,05 lo cual indica que el efecto de estos dos extractos es inferior al el Digluconato de CHX 0,05 % mas CPC 0,05%, de otro lado al realizar la comparación con el extracto al 100% concluimos que este

tiene un efecto inhibitorio comparable al Digluconato de CHX 0,05% mas CPC 0,05% (p valor mayor a 0,05).

Finalmente, también comparamos el Digluconato CHX 0,12% mas CPC 0,05% con cada uno de nuestros tres extractos, nuevamente en este caso también el p valor para los extractos al 25 y 50% son menores a 0,05 lo cual indica que el efecto de estos dos extractos es inferior al el Digluconato 0,12 % mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05%, de manera análoga al realizar la comparación con el extracto al 100% concluimos que este tiene un efecto inhibitorio comparable al Digluconato clorhexidina 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (p valor mayor a 0,05).

Tabla 05: Escala de Duraffourd

Promedio de diámetro del halo de inhibición	Efecto inhibitorio	Muestra
$D \leq 8 \text{ mm}$	Sensibilidad nula (no hay efecto inhibitorio)	
$9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$	Sensible (efecto inhibitorio intermedio)	
$15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$	Muy sensible	Ext. Et-OH 25, 50, 100% y Digluconato CHX 0,05 Y 0,12% mas cloruro de Cetilpiridinio 0,05%
$D \geq 20 \text{ mm}$	Sumamente sensible	

Fuente: (Ortega, 2016, p.58)

La tabla 05 nos muestra que el extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* a la concentración 25, 50 y 100% presenta un efecto inhibitorio muy sensible en la Escala de Duraffourd de igual manera las dos concentraciones de Digluconato de CHX 0,05 y 0,12% mas CPC 0,05%.

4.2. Discusión

El presente estudio se comparó el efecto inhibitorio del extr. EtOH de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y el Digluconato de clorhexidina al 0,05% y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridino 0,05% sobre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175 estudio comparativo in vitro, en el cual las diferentes concentraciones de *Rosmarinus officinalis* (Romero) presentaron diferentes medias de diámetros de halo de inhibición: Donde a la concentración de 100% presento un promedio de 16,00 mm (s) 1.34, al 50% con 15,67 mm (s) 0,48 y al 25% con 15,19 mm (s) 0,81. Para los control positivo Digluconato de CHX al 0,05 y 0,12% mas CPC 0,05% fueron 16,76 mm (s) 0,83 y 16,95 mm (s) 0,87. Los extractos etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al aumentar la concentración aumenta el efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175.

En la prueba de la normalidad de Kolmogorov-Smirnovb y Shapiro-Wilk presenta un valor $p < 0,05$ no presenta distribución normal. Por esta razón se decidió el uso de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis el cual tuvo $p < 0,05$ que concluye que al menos tiene alguno de las concentraciones tiene efecto inhibitorio. Para saber cuál de las concentraciones se usó la comparaciones múltiples de Games-Howell del cual se concluyó que las tres concentraciones de *Rosmarinus officinalis* (Romero) presentan efecto inhibitorio. Las concentraciones de 25 y 50% su fue $p < 0,05$ que el de la Digluconato de clorhexidina 0,05%; sin embargo a la concentración de Ext. EtOH al 100% tiene un efecto comparable al Digluconato de CHX 0,05% mas CPC 0,05% ($p > 0,05$). Por otra parte Digluconato de CHX 0,12% mas CPC 0,05% fue

mayor a las concentraciones 25 y 50% sin embargo a la concentración 100% tienen efecto inhibitorio comparable ($p > 0,05$).

En la presente investigación de acuerdo a la escala de Duraffourd las tres concentraciones 25, 50 y 100% presentan actividad inhibitoria muy sensible por estar en un rango 15 mm a 19mm igualmente que las dos concentraciones de Digluconato de CHX 0,05 y 0,12% mas CPC 0,05%.

Por otra parte, **Ortega E. (2016)** evaluó la “Efectividad de inhibición del extr. De Tomillo y Romero (al 10%) sobre al *S. mutans* en 20 muestras. De acuerdo a las comparaciones múltiples de Turkey realizado, determino el efecto provocado por la aplicación de la solución de Clorhexidina 2% fue estadísticamente diferente respecto con las soluciones de los extractos de Tomillo, Romero 10%, y el agua destilada. La clorhexidina 2% tuvo un halo entre 14 mm a 22 mm de diámetro y el 50% de los valores por encima de 16 mm. Los extractos acuosos de Romero y Tomillo al 10% fue 6 mm al igual que el agua destilada. Por consiguiente, resulto nula la sensibilidad de la bacteria *Streptococcus mutans* por estar por debajo de 8 mm.

Sin embargo, **Alves M, Higino J, Eleuterio P, Crovella S, Caldas A y Tavares A. (2016)** realizo “dentifrice containing extract of *Rosmarinus officinalis* Linn. an Antimicrobial Evaluation”. Con respecto a *Streptococcus mutans* no hubo diferencias significativas al comparar actividad antimicrobiana de un dentrífico que contiene un extracto etanólico de Romero (TR) con Propoleo (TH) ($p=0,914$), demostrando así una actividad antimicrobiana similar entre las pastas de dientes. Encontró una diferencia significativa en la comparación entre TR con control negativo (TNC) ($p=0,003$), TR con Triclosan control positivo (TPC) ($p=0,000$). Se observó que la TR no

mostraba una diferencia estadística con respecto a la TH para inhibir a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*, mientras que la TH, era mas activa en *Lactobacillus rhamnosus*. La pasta de dientes que contenía extracto de Romero tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus oralis* y *Lactobacillus rhamnosus*, revelando una actividad antimicrobiana similar a las pastas dentales comerciales.

Marin G. (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. La acción bacteriana del extr. Acuoso de Salvia (*Salvia officinalis*) al 100% sobre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), si hay diferencia de las medias a los 24 y 48 horas (12,65 a 15,35). Mientras el Romero al 100% 24 a 48 horas (6,15 = 6,15) y en el caso de Romero mas Salvia 100% sus medias 24 a 48 horas (12,60 a 15,40), no hay diferencia significativa entre la medida de los halos de inhibición del Romero y la Salvia pura. El extracto acuoso de Salvia al 100% fue mejor bactericida combinado con el Romero.

Por otra parte, **Solano X, Moya T y Zambrano M. (2016)** determinarán si hay inhibición de crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) in vitro mediante el uso de extractos acuoso y oleoso de Romero. Los extractos acuosos *Rosmarinus officinalis* (Romero) 1,5 y 3% y el agua destilada no tuvieron halo de inhibición 0 mm por lo contrario el extracto oleoso *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 50% tuvo una media de 11,93 mm ($p < 0,001$) y la CHX tuvo una media de 16,13

mm ($p < 0,001$). No se encontró diferencias entre el extr. Oleoso y la CHX 0,12% ($p > 0,05$) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

García MG, Zurlohe M, Montero E, Alonso B, Serrano J, Sanz M, et al. (2016) compararon el efecto de dos nuevas fórmulas de enjuagues bucales con Clorhexidina y Cloruro de Cetilpiridinio (CPC) después de un raspado y alisado radicular (SRP). En el presente estudio, no se pudieron observar diferencias entre el enjuague bucal tradicional (0,12 CHX y 0,05% CPC) y el reformulado con baja concentración de CHX (0,03%), Se incluyeron 30 pacientes (10 por grupo). Después de 1 mes, hubo diferencias significativas entre los grupos en los niveles de placa ($P = 0.016$) ya que el test-1 mostró menos sitios con placa que el test-2 (31,15% [error estándar-SE 2,21%] versus 49,39% [SE 4,60%], respectivamente). No se encontraron diferencias significativas para el paciente global percepción del producto o en los efectos adversos. Grupos de prueba mostraron mejores resultados en niveles y proporciones ($P = 0,022$) de *Capnocytophaga* spp.

Así también, **Purca T. (2013)** determinó la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones de extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra la flora salival in vitro. Las medias de halos de inhibición en las diferentes concentraciones de extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* (Romero) EERO de 25 mg/mL = 12,47 mm, EERO 50 mg/mL = 17 mm y el EERO de 75 mg/mL = 20,56 mm, la CHX 0,12% = 15,56 mm y el H₂O destilada = 5 mm.

Mostacero I, Bustamante O, Mostacero L, Carranza L y Ruiz M. (2013) determinaron la actividad inhibitoria in vitro de la infusión de Romero contra *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). El análisis de diferencias significativas (Games Howerd). Los resultados obtenidos para la infusión de Romero al 40% presento mayor eficacia con una media de 20530000,00 y una diferencia significativa de 0,0028 a los dos tiempos de exposición 1 y 5 minutos; mientras el 20% obtuvo una media de 2016666.67 tanto 1 y 5 minutos mostro una diferencia significativa de 0,0002 con respecto al control; donde a mas concentración y tiempo de explosión será mayor el efecto inhibitorio sobre el *Streptococcus mutans*.

San Román I. (2013) determino la eficacia antimicrobiana del extr. EtOH de *Rosmarinus officinalis* sobre cultivos de bacterias anaerobias de bolsa periodontal in vitro. Las medias EERO 25mg/mL (9,10), extr. EtOH 50 mg/mL (11,46), extr. EtOH 75 mg/mL (13,35), CHX 0,12% (13,44) y H₂O destilada (5,00).

Pinheiro M, Araujo D, Dantas L, Cavalcanti y Nascimento W. (2012) evaluaron el efecto bacteriostático y bactericida de tinturas sobre bacterias de la caries dentaria y comparada con la Clorhexidina. Sobre *Streptococcus mutans* CMI fue 6,25 mg/mL, para las tinturas; T1 *Rosmarinus officinalis* (Rosemary), T2 *Calendula officinalis* (Marigold) y T3 *Mikania glomerata* (Guaco) y CMB fue de 12,5 mg/mL para T1, T2 y 6,25 mg/mL para T3. Con *Streptococcus oralis*, todo las tinturas presentaron CMI y CBM de 0,78 mg/mL. Con respecto a la Clorhexidina la CMI y CBM fueron 0,04 mg, contra (*S. mutans*) *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis* entretanto el efecto antimicrobiana de la CHX fue mayor a las tinturas. Sin embargo la tintura de guaco demostró ser mejor que las otras tinturas.

Zohreh D, Aghazadeh M, Adibpour M, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Mosannen P, et al. (2011) compararon el efecto antimicrobiano de diez extractos de plantas contra *Streptococcus mutans* con Clorhexidina in vitro. La media de la zona de inhibición para la clorhexidina fue de 14,06 mm, S.D.= 1,70. Entre las plantas de prueba, hubo un halo indicativo de la falta de crecimiento alrededor de los discos de Romero y Clavo de olor. La media de la zona inhibitoria relacionadas con Clavo de olor y Romero fue 15,26 mm; SD = 1,55, y 11,52 mm; SD = 0,96 mm respectivamente. Se tomó una muestra de la zona de inhibición alrededor de cada planta. Se procedió a hacer un frotis y tinción con coloración Gram. *Streptococcus mutans* luego fue observado en el microscopio. Probablemente, el pH ácido del clavo de olor condujo a lisis de medios de cultivo agar sangre. El pH del clavo de olor se determinó con el papel de cromatografía encontrándose entre 2,0 a 2,5. La zona inhibitoria relacionadas con Romero fue de 11,52 mm – DE 0,96 y es significativamente menor que la CHX ($p = 0,001$).

Battagin J. (2010) investigo la actividad inhibitoria de los extractos vegetales sobre la actividad de Glucosiltransferasa GTF sobre el crecimiento de *S. mutans* in vitro. El extr. H₂O de Romero fueron prometedores, demostró la inhibición significativa de la actividad GTF (50 – 75%) en concentraciones superiores a 4 mg/mL, por otra parte, los otros extractos (*Camellia sinensis* y *Ilex paraguariensis*) examinados fueron incapaces de inhibir el crecimiento bacteriano.

Bernardes W, Lucami R, Tozatti M, Souza M, Andrade A y Da Silva A, et al. (2010) determinaron efectividad inhibitoria de extractos crudos de EtOH/H₂O de hojas y tallos de *Rosmarinus officinalis* L. sobre a las bacterias responsables de

iniciar la caries dental in vitro, De acuerdo a la lectura del HPLC del EtOH/H₂O de *Rosmarinus officinalis* L de determinaron los siguientes metabolito. El ácido rosmarínico (1), no mostró ninguna actividad contra los bacterias seleccionados. El análisis de HPLC reveló la presencia de bajas cantidades de ácido ursólico (4) y ácido oleanólico (5) en las fracciones obtenidas. Los resultados sugieren que la efectividad antibacteriana del extr. de las hojas de Romero puede ser atribuido principalmente a la acción de ácido carnósico (2, t_R 32,16 min) y carnosol (3, t_R 27,41 min). Ambos 2 y 3 mostraron efectos inhibitorios significativos contra los patógenos. Mostraban una mejor actividad antibacteriana que el timol, un agente antimicrobiano.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% presenta un efecto inhibitorio estadísticamente significativo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (p valor menor a 0,05).
2. El extr. etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a la concentración de 100% presenta un efecto inhibitorio estadísticamente comparable al Digluconato de CHX 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0.05% sobre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a la concentración de 25 y 50% presenta efecto inhibitorio significativamente inferior al Digluconato de Clorhexidina 0,12% mas Cloruro Cetilpiridinio 0,05% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

5.2. Recomendaciones

1. Se recomienda hacer estudios comparativos de extractos etanólico *Rosmarinus officinalis* (Romero) por regiones geográficas del Perú para determinar el porcentaje de metabolito secundarios principales y la separación de sus elementos mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia).
2. Elaborar un colutorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) para la prevención de la caries dental.
3. Realizar campañas informativa a cerca del beneficio *Rosmarinus officinalis* (Romero) en la prevención de la caries dental.
4. Incentivar a los agricultores a masifica el cultivo a escala *industrial Rosmarinus officinalis* (Romero) para la extracción del aceite esencial y el extracto etanólico para disminuir el costo de los productos finales como en forma de colutorios y pasta dentales y de esta manera ser accesible a toda la población.

CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y ANEXOS

6.1. Referencias bibliográficas

1. Calixto M. plantas medicinales utilizados en odontología. Kiru. 2006;3(2)80-85
2. OMS Organización Mundial de la Salud [internet] Suiza: OMS; 2017 [citado abril 2012] Salud bucodental nota informativa N°318 bucodental [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
3. Minsa Ministerio de salud [internet] Perú: Minsa; 2017 [citado noviembre del 2017] Minsa: 85% de niños menores de 11 años tiene caries dental por inadecuada higiene bucal [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/?op=51¬a=25670>
4. Ortega E. Efectividad de inhibición del extracto de tomillo y de romero al 10% frente al *Streptococcus mutans* en 20 muestras [tesis]. Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de odontología; 2016.
5. Alves M, Higino J, Eleuterio P, Crovella S, Caldas A y Tavares A. dentifrice Containing extract of *Rosmarinus officinalis* Linn.: An Antimicrobial Evaluation. Braz. Dent. J. 2016 27(5): 497-501.
6. Marin G. Efectividad del extracto acuoso de salvia, romero y salvia-romero al 100% como bactericida sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio microbiológico in vitro [tesis] Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Odontología; 2016.

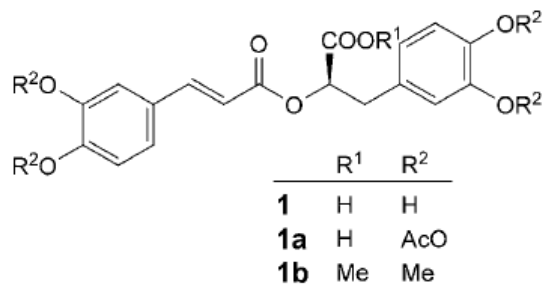
7. Solano X, Moya T y Zambrano M. Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero). Rev. Odontol. 2016; 19:29-34.
8. García MG, Zurlohe M, Montero E, Alonso B, Serrano J, Sanz M, *et al.* Evaluation of new chlorhexidine and cetylpyridinium chloride-based mouth rinse formulations adjunctive to scaling and root planing: pilot study. Int J Dent Hygiene. 2016; (1) 1 - 11
9. Purca T. Efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival [tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos del Perú. Facultad de Odontología;2013.
10. Mostacero I, Bustamante O, Mostacero L, Carranza L y Ruiz M. Efecto inhibitorio in vitro de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans*. Rev Tzhoecoen.2013;5:35-48.
11. San Román I. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal [tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos del Perú. Facultad de Odontología;2013
12. Pinheiro M, Araujo D, Dantas L, Cavalcanti Y, Nascimento W. Efeito antimicrobiano de tinturas de productos naturais sobre bacterias da carie dentaria.Rev Bras promoc Saude, Fortaleza.2012;25:197-201.

13. Dalirsani Z, Aghazadeh M, Adibpour M, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Mosannen P, *et al.* In vitro Comparison of the antimicrobial activity of ten herbal extracts against *Streptococcus mutans* with chlorhexidine Rev, J,Applied Sci.2011;11:878-882.
14. Battagin J. Cinética enzimática e efeito de extractos naturais na atividade da enzima Glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* [tesis]. São Paulo: Universidad São Francisco ciencias de la salud; 2010.
15. Bernades W, Lucarni R, Tozatti M, Souza M, Andrade A, da Silva A *et al.* Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: Relevance of Carnosic acid and Carnosol. Chem Biodivers. 2010; (7): 1835-1840.
16. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. Vitae. 2010; (2): 149-154.
17. Borges A, Aparecida C, Freire F, Junqueira J, Cardoso A. atividade antifúngica dos extractos glicolicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. Sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Braz Dent Sci.2009; 38:111-116.
18. Chevallier. Enciclopedia de plantas medicinales guía de consulta con mas 550 hierbas clave y sus usos medicinales. Madrid: Dorling Kindersley, CESMA,SA;1997.

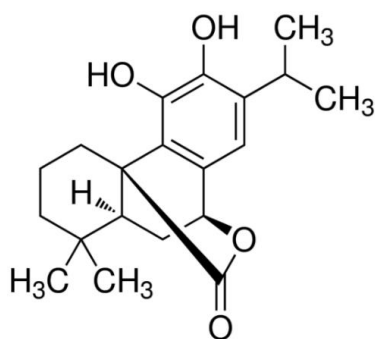
19. Begum A, Sandhya S, Ali SS, Vinod SR, Banji D. An in-depth review on the medical flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Acta Sci Pol. 2013;1:61
20. Quispe R. Refugios vegetales para el fomento de la entomofauna benéfica en el agroecosistema del cultivo de maíz en la Molina [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina. Escuela de Posgrado Maestría en Entomología; 2015.
21. Linares N. Plantas medicinales. Madrid: Linares Gimeno Nuria editor; 2013.
22. Muñoz L. plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero). ISSN:0211-9714. 2002;8: 105-118.
23. Edwards SE, Williamson IE, Heinrich M. Phytopharmacy. UK: Wiley Blackwell; 2015.
24. Alexander LM, Bruce S. Dental Herbalism natural therapies for the mouth. Canada: Healing arts press; 2015
25. Ashton A. Issues in industria, applied, and environmental chemistry. Atlanta USA: Scholarly editions; 2011.
26. Sáenz SR. Propedeutica: el acceso inicial a clínica en odontología II. Bogota: Editorial Manual moderno; 2017.
27. Garg N, Garg A. Textbook of dentistry. 2 a ed. India: Jaypee Brothers Medical Publisher; 2013.

28. Velásquez VO, Podestá M. Adquisición temprana de *Streptococcus mutans* y caries dental. Dental Tribune Hispanic & Latín América. 2014;11(8):22-26.
29. Parrone CM. Placa dental y microbiología de la caries dental. En: Self RT. Cariología Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. Caracas: actualidades Médico odontológicas Latinoamérica, C.A; 1997.37-53.
30. Ojeda JG, Oviedo EG, Salas A. *Streptococcus mutans* and dental caries 2013.Rev CES Odont. 2013; 26(1):44-56.
31. Abanto M. efecto antibacteriano in vitro del extrato etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [tesis]. Trujillo Perú: Universidad Nacional de Trujillo;2016.
32. Meyer H, Sebastian LP, Ekstrand KR. Manejo de la caries ciencia y práctica clínica. Venezuela: Amolca; 2015.
33. Balagopal S, Arjunkumar R. Chlorhexidine: The Gold Standard Antiplaque Agent. J. Pharm. Sci. & Res.2013;5(12):270–274.
34. Steenberghe V, Quiryne M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Rouche W. Effect of different clorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2001;1127-36.

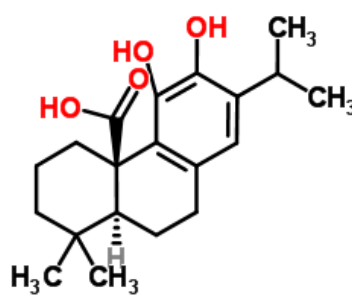
6.2. Anexos



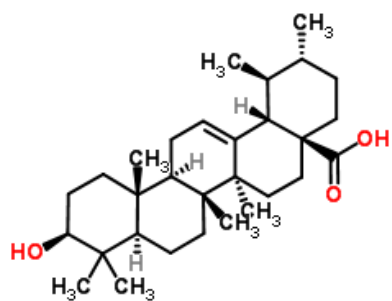
1



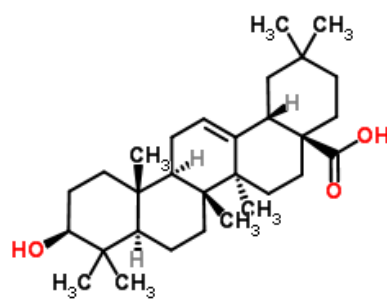
2



3






4



5

ANEXO 1: Chemical structure of rosmarinic acid (1) and its derivatives (1a and 1b), Carnosic acid (2), carnosol (3), ursolic acid (4), and oleanolic acid (5)

ANEXO 2: Taxonomía *Rosmarinus officinalis* (Romero)

  **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 229-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo y hoja) recibida **Agustín Félix LEON ROMERO**, estudiante de la Universidad Particular NORBERT WIENER, ha sido estudiada y clasificada como: ***Rosmarinus officinalis* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

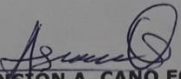
GENERO: *Rosmarinus*

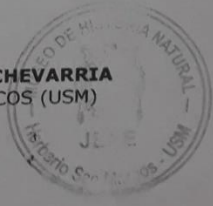
ESPECIE: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre vulgar: "Romero"
Determinado por Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 23 de octubre de 2017


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



DDB



ANEXO 3: *Rosmarinus officinalis* (Romero)

ANEXO 4: Estructuras de metabolitos secundarios

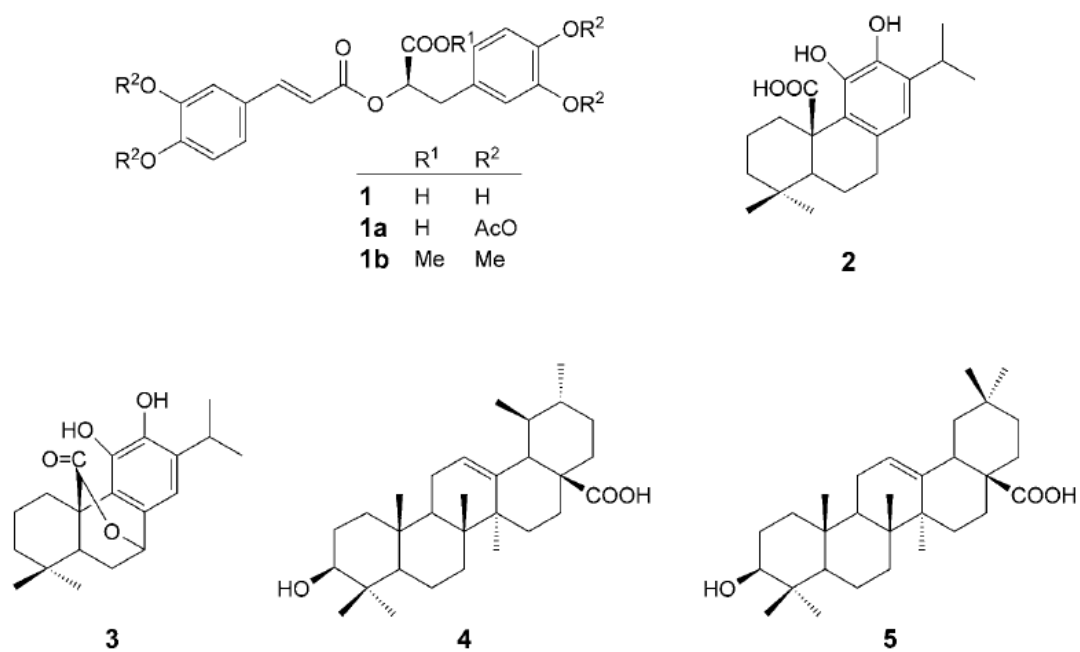
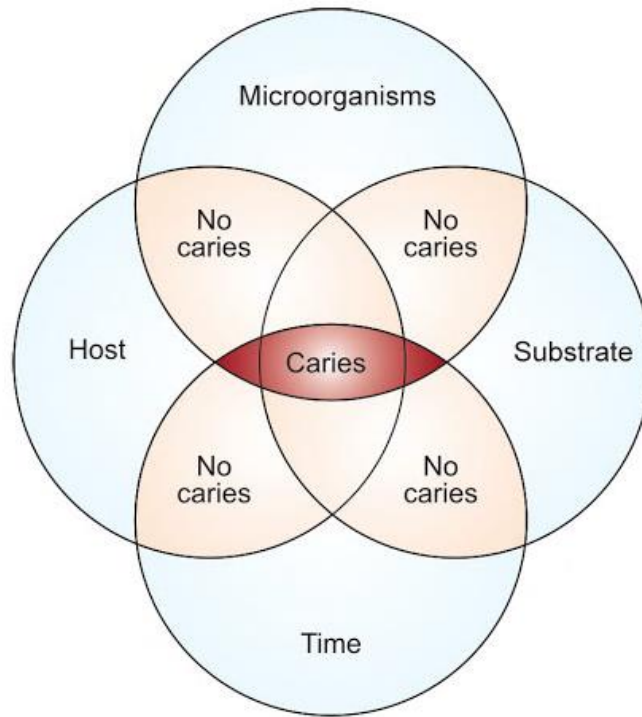
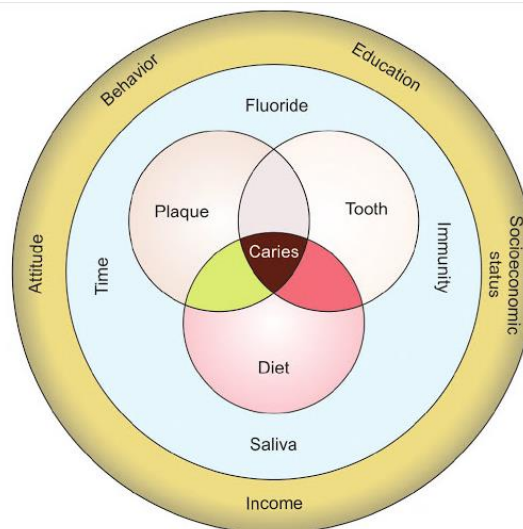


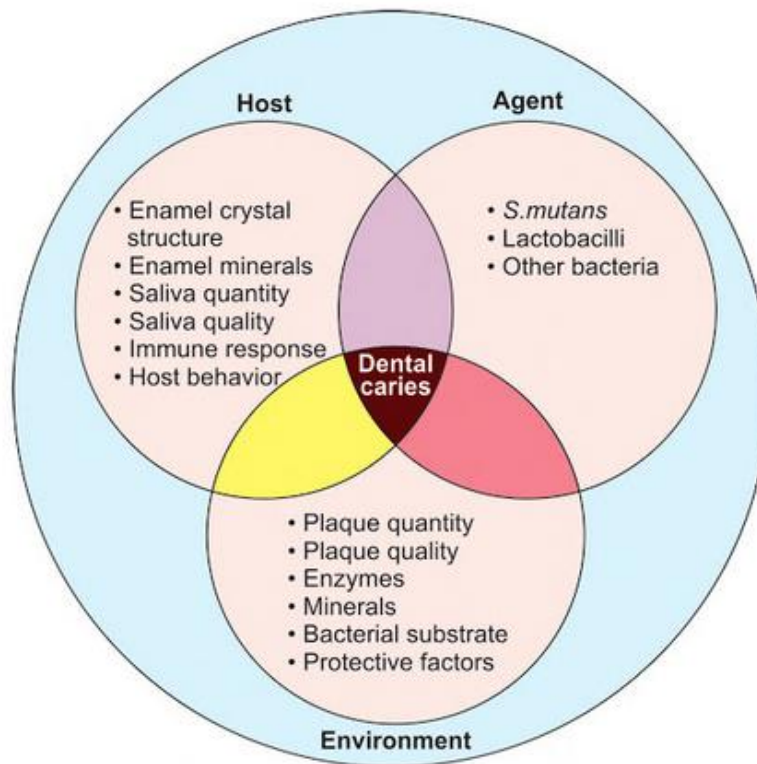
Figura. 4 Chemical structure of rosmarinic acid (1) and its derivatives (1a and 1b), Carnosic acid (2), carnosol (3), ursolic acid (4), and oleanolic acid (5)²⁵.



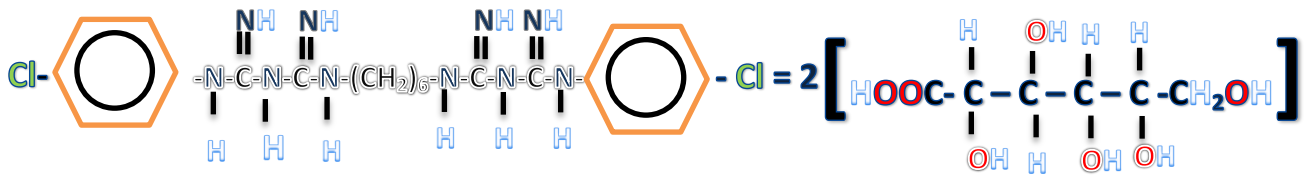
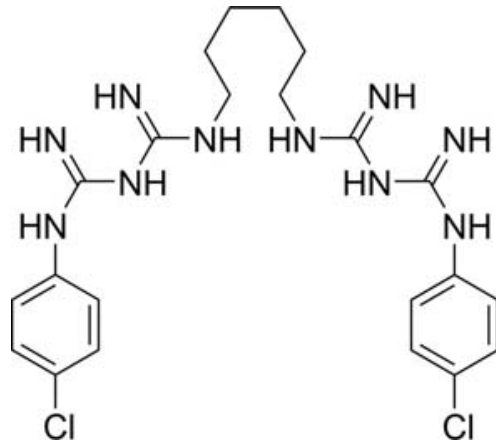
(ANEXO 5: Local factors affecting incidence of dental caries)²⁷.



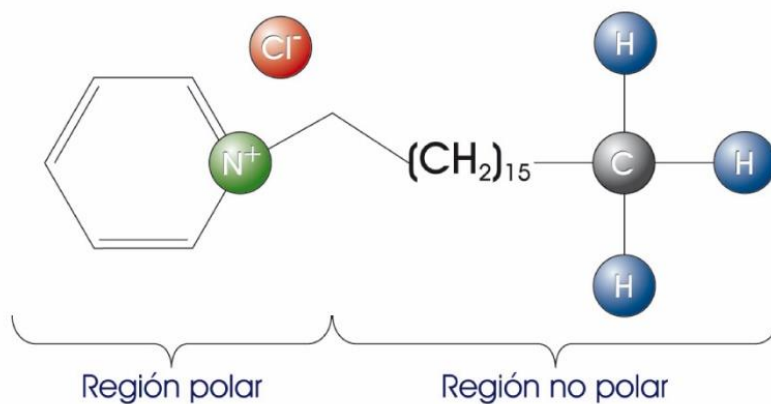
(ANEXO 6: Factors affecting caries. here plaque, tooth and diet are shown as three main prerequisites for caries development (Keys's triad). Other factors modify the interplay between these factors)²⁷.



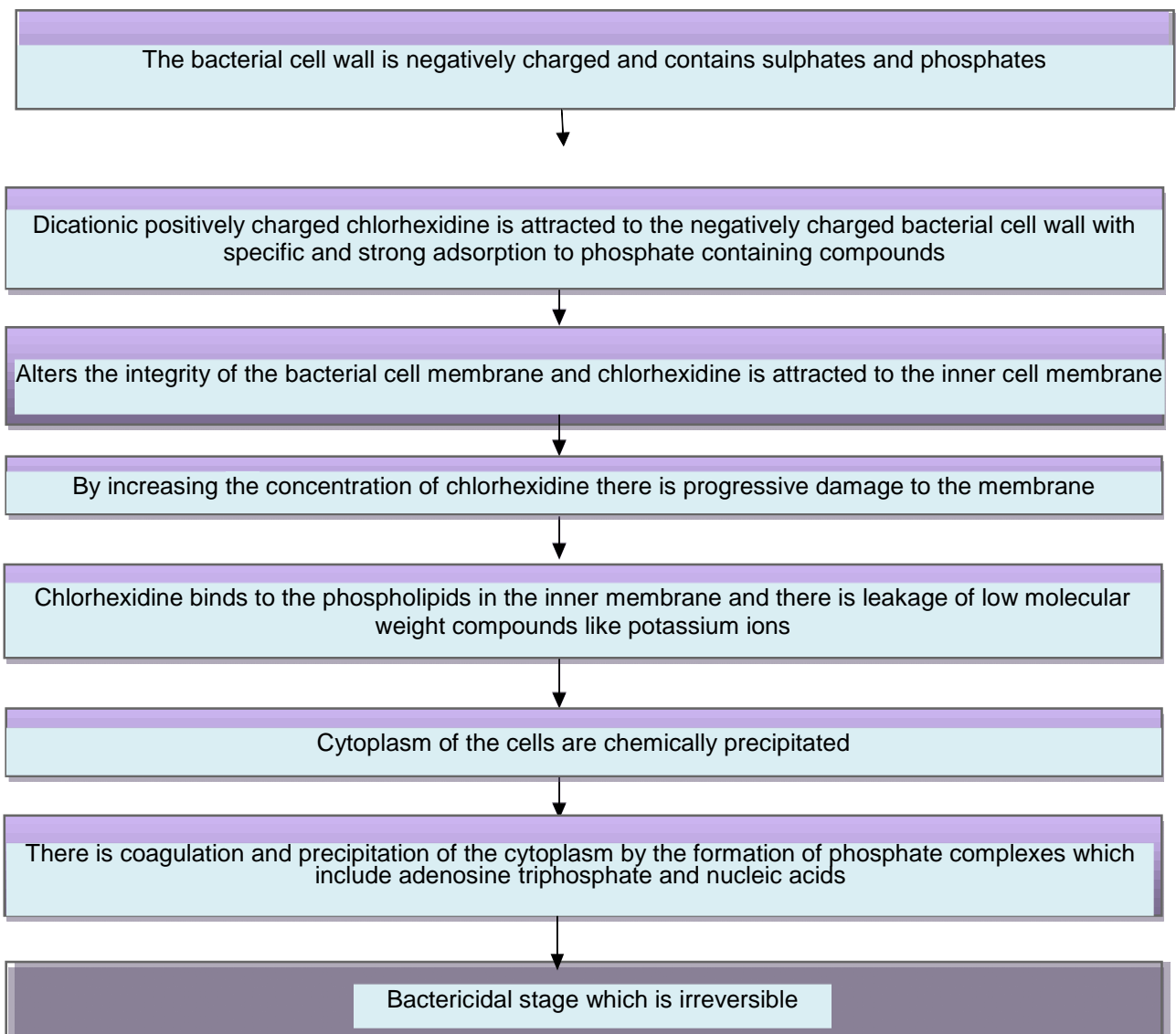
ANEXO 7: Variations in host, agent and environmental factors affect incidence of caries)²⁷.



ANEXO 8 (Figura 8. Estructura química de la clorhexidina y el Digluconato de clorhexidina



ANEXO 9 (Figura 9. Estructura de Cloruro de Cetilpiridinio



ANEXO 10: Mecanismo de acción de la clorhexidina³⁴.

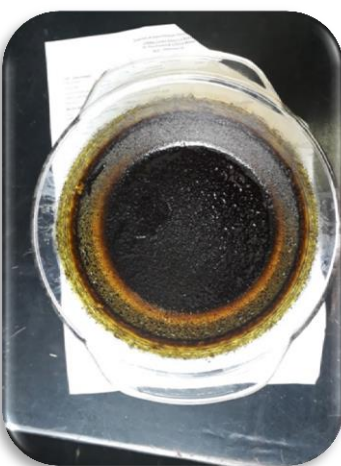
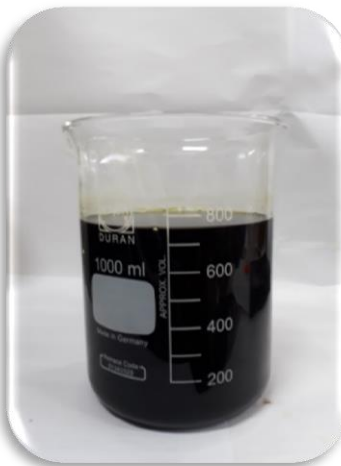
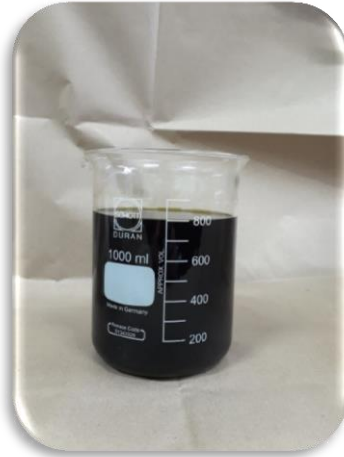
ANEXO 11: Formato de recolección de datos

"EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0,05 Y 0,12% MAS CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO"						
Muestra	H ₂ O bidestilada	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y halos de inhibición en mm			Digluconato de Clorhexidina al 0,05 mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05%. y halos de inhibición en mm	Digluconato de Clorhexidina al 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05%. y halos de inhibición en mm
Numero	Blanco	25%	50%	100%	CHX 0,05%	CHX 0,12 %
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						

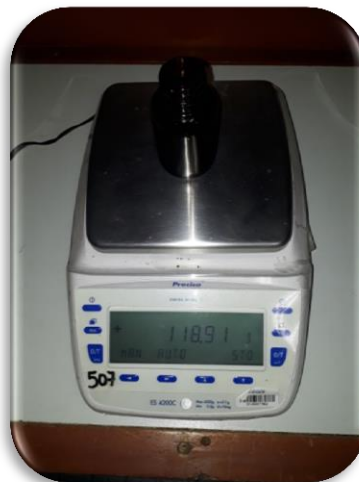
ANEXO 12 - A: Obtencion del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) lavado con agua destilada los tallos con las hojas y secado a temperatura ambiente luego se procedio a la selección de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) para el secado en la estufa 40 °C; despues del secado se procedio a triturar las hojas en un mortero.





ANEXO 12- B: Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero); maceración, filtrado del extracto, secado en la campana y luego secado en la estufa.



ANEXO 12 - C: Embase del extracto seco de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y rotulado. Peso del extracto 17.43 g.



ANEXO 13-A: Manejo de residuos biológico – infecciosos en el laboratorio



	<p>Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos en el INMEGEN</p>		CODIGO 15
			Rev.

4. Descripción del Procedimiento para generación, identificación y envasado de residuos biológico-infecciosos

Secuencia de etapas	actividad	Responsable
1.0 Genera residuo	1.1 Al realizar sus actividades técnicas, genera el residuo - Residuo biológico-infeccioso	Personal generador (investigadores, técnicos, enfermeras)
2.0 Identifica el tipo de residuo	2.1 Identifica el tipo de residuo: Biológico-infecciosos, sangre y sus componentes, fluidos corporales, cultivos o cepas de agentes infecciosos, no anatómicos, patológicos y punzocortantes - Residuos biológico-infeccioso	Personal generador (investigadores, técnicos, enfermeras)
3.0 Envasado de residuos	3.1 Separa el residuo y los deposita dentro de su envase correspondiente por su tipo y/o clasificación, según la NOM 087-ECOL-SSA12002. 3.2 Envasa según norma: Residuos de sangre y sus componentes en forma líquida, cultivos y cepas de agentes infecciosos y no anatómicos en bolsa de color roja, Residuos patológicos en amarilla y residuos punzocortantes en contenedores rígidos para punzocortantes.	Personal generador (investigadores, técnicos, enfermeras)
4.0 Tratamiento en el sitio	4.1 Trata en el sitio: Sangre líquida, los componentes de la sangre y todos los fluidos corporales excepto orina, se pueden tratar con hipoclorito de sodio u otro desinfectante que garantice la eliminación de agentes infecciosos. - Residuo biológico-infeccioso	Personal generador (investigadores, técnicos, enfermeras)

CONTROL DE EMISION			
	Elaboro:	Reviso:	Autorizo:
Nombre			
Firma			
Fecha			

ANEXO 13-B: Manejo de residuos biológico – infecciosos en el laboratorio

	Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos en el INMEGEN		CODIGO 15
			Rev.

5.0 Trata residuos en autoclave	<p>5.1 Decide: ¿Los residuos pueden ser tratados en autoclave?</p> <p>Si: Trata los cultivos y cepas de agentes infecciosos en autoclave</p> <p>No: Se da tratamiento en el sitio</p> <ul style="list-style-type: none"> - Residuo biológico-infeccioso 	Técnico de laboratorio
6.0 Deposita los residuos en los contenedores	<p>6.1 Deposita las bolsas de acuerdo a su clasificación en los contenedores que se encuentran en el área generadora de residuos para su recolección.</p> <p>6.2 Deposita los residuos infecciosos dentro de los contenedores rojos (bolsas y contenedores para punzocortantes) bolsa amarilla, (con residuos anatomopatológicos) la deposita dentro del ultracongelador a -70°C para ser colectado posteriormente por el personal calificado.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Residuo biológico-infeccioso 	Personal generados (investigadores, técnicos, enfermeras)
7.0 Supervisa	<p>7.1 Supervisa la correcta clasificación de los residuos, los datos anotados en la bitácora y el depósito correcto en contenedores,</p> <ul style="list-style-type: none"> - bitácora 	Personal responsable de los residuos en el área generadora.
Fin del procedimiento		

CONTROL DE EMISION			
	Elaboro:	Reviso:	Autorizo:
Nombre			
Firma			
Fecha			

ANEXO 14- A: Proceso de preparación y obtención de resultados de la parte microbiológica



Fotos de proceso de activación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en laboratorio de microbiología de la Universidad Privada Norbert Wiener.

ANEXO 14- B: Preparación del agar - sangre



Fotos de la preparación de agar Mueller Hinton – Sangre con el inoculo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en laboratorio de microbiología de la Universidad Privada Norbert Wiener.

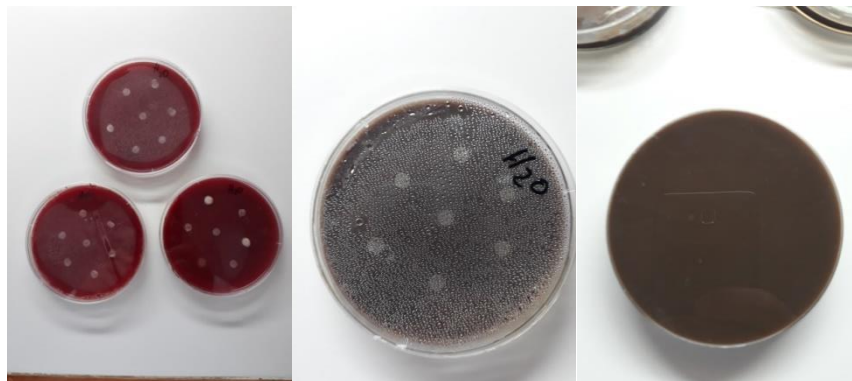
ANEXO 14 C: Preparación del agar sangre mas el inoculo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, plaqueado, ubicación de discos y aplicación de las soluciones.



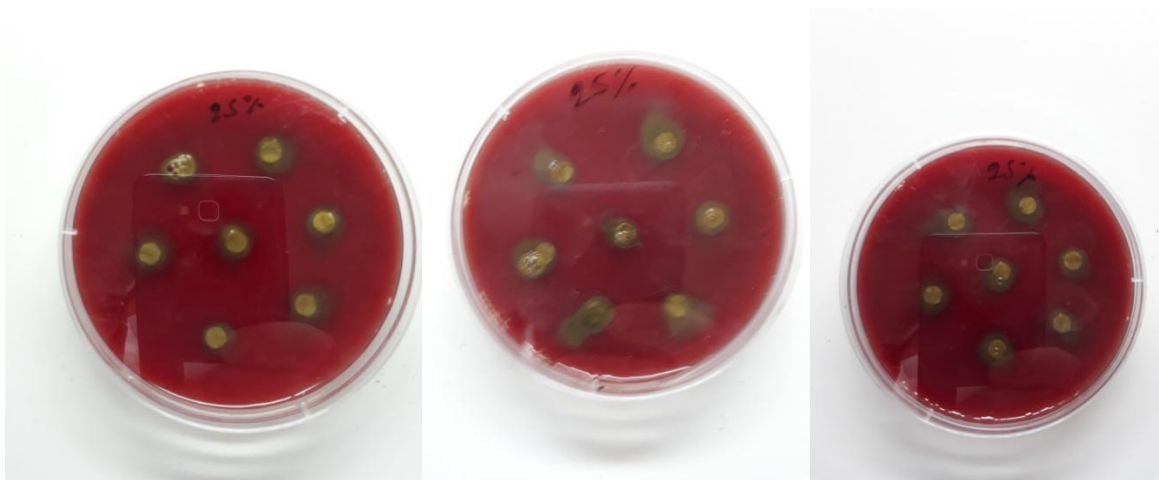
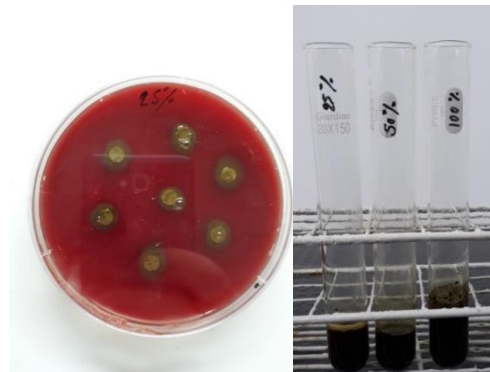
ANEXO 14 D: Soluciones de agua bidestilada, Digluconato de clorhexidina 0,05% mas cloruro de Cetilpiridinio 0,05% y Digluconato de clorhexidina 0,12% mas 0,05% cloruro de Cetilpiridinio. Placas en jarra de Gaspack después de la aplicación de las soluciones en los discos y la generación de anaerobiosis con el método de la vela.



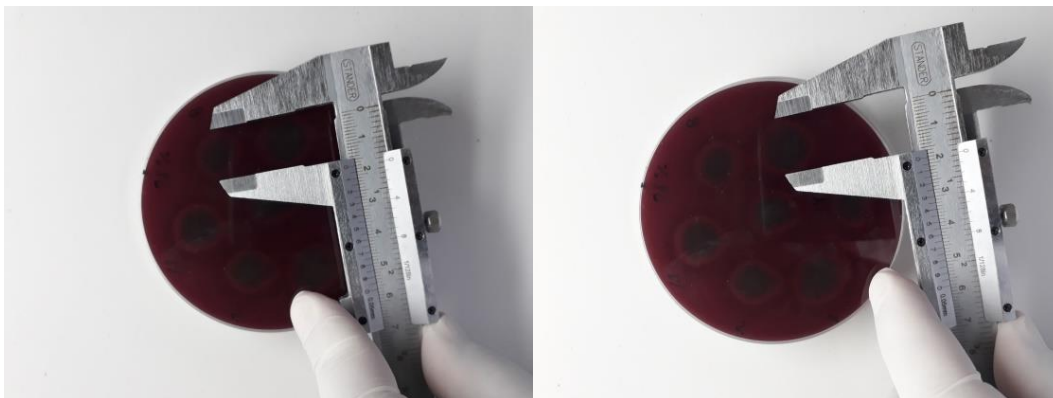
ANEXO 14 E: Incubación de las placas por 48 horas, luego observación visual de la placa con la muestra que se les aplico agua bidestilada que no presento ningún halo de inhibición.



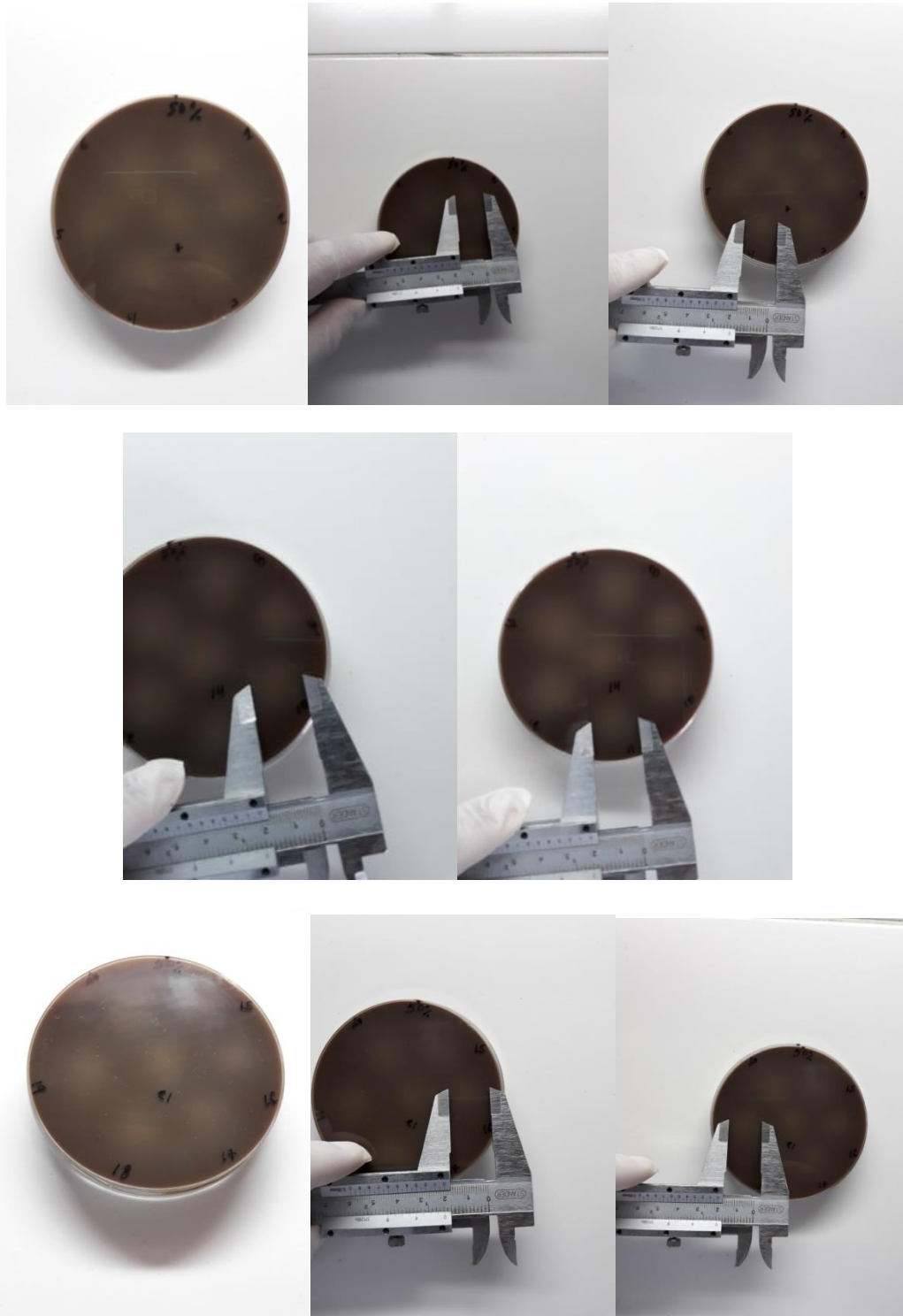
ANEXO 14 F: Pesado y preparado del extracto de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a las concentraciones de 25, 50 y 100% (0,25, 0,50 mg/mL y 1 g/mL). Aplicación de 10 microlitros a cada disco posteriormente incubado por 48 horas



ANEXO 14 G: Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 25% después de 48 horas de la incubación.



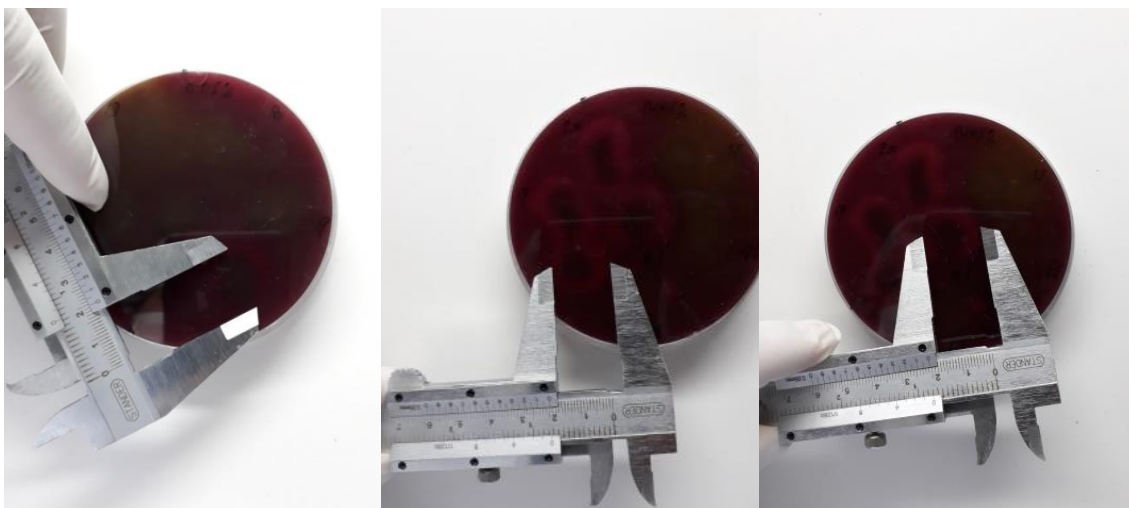
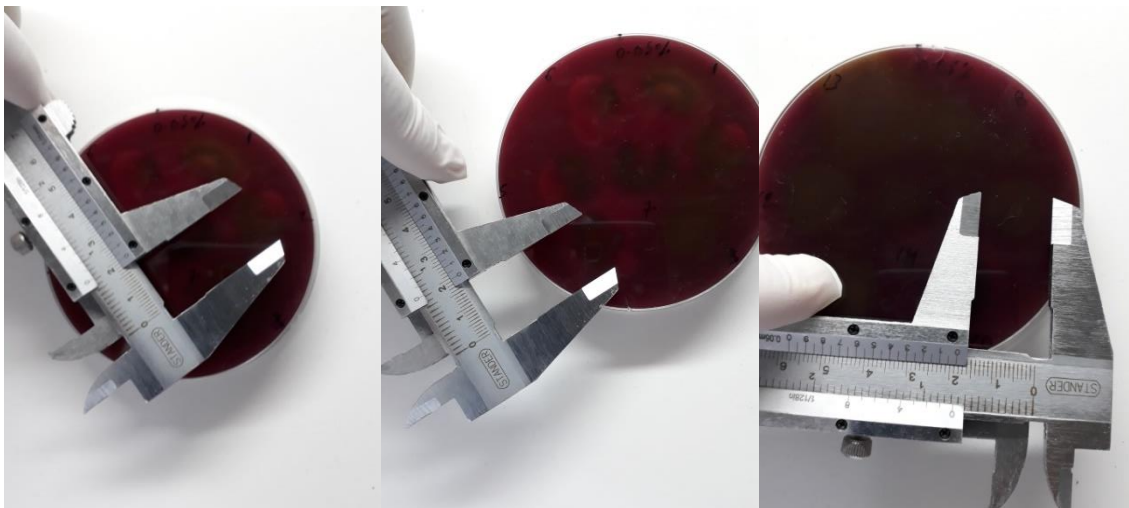
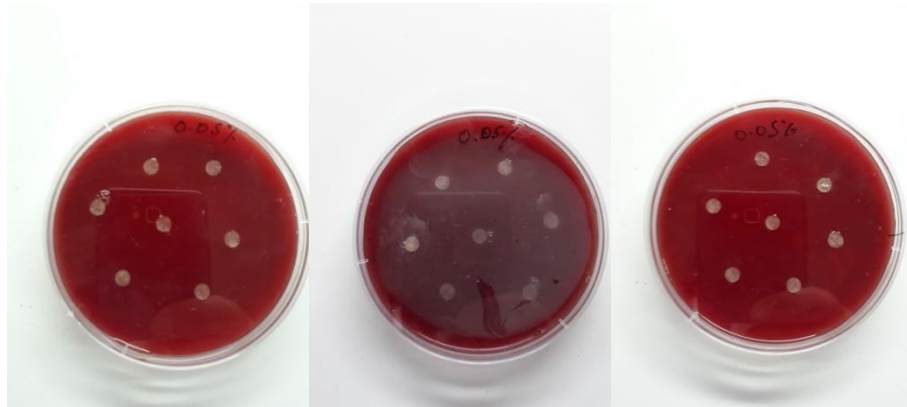
ANEXO14 H: Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 50% después de 48 horas de la incubación.



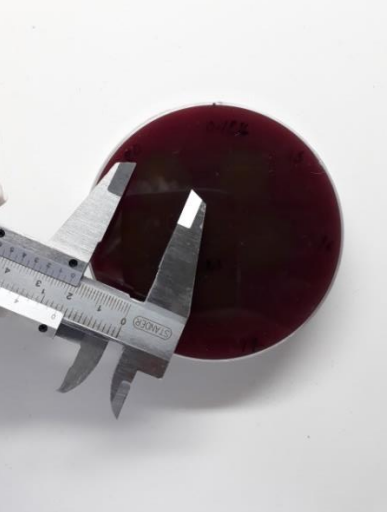
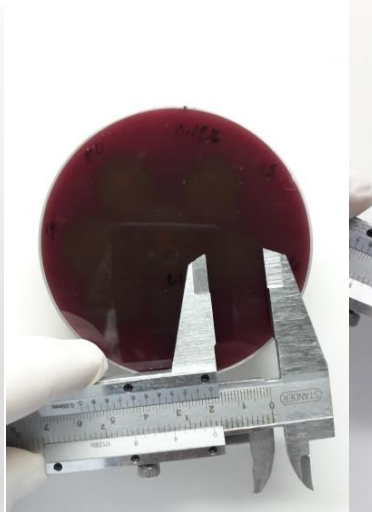
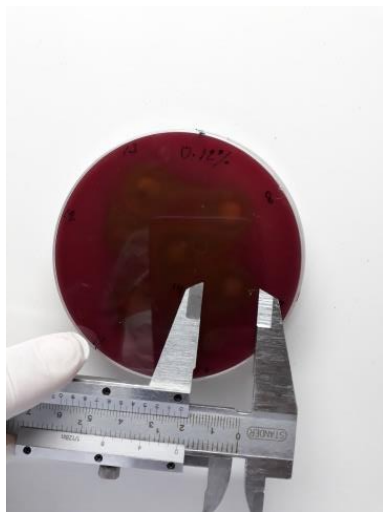
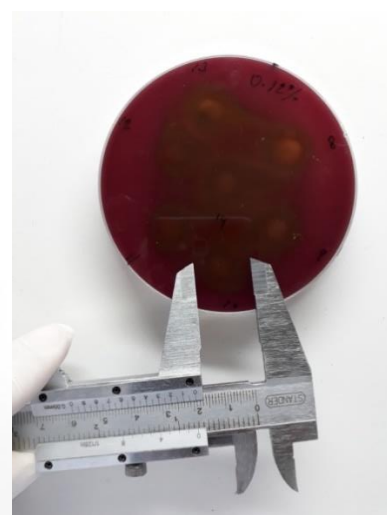
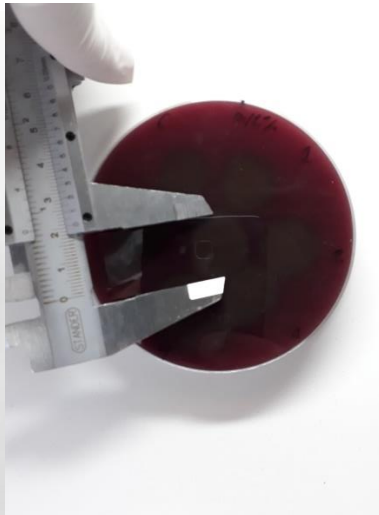
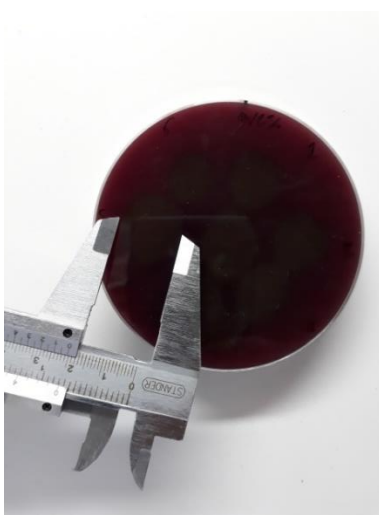
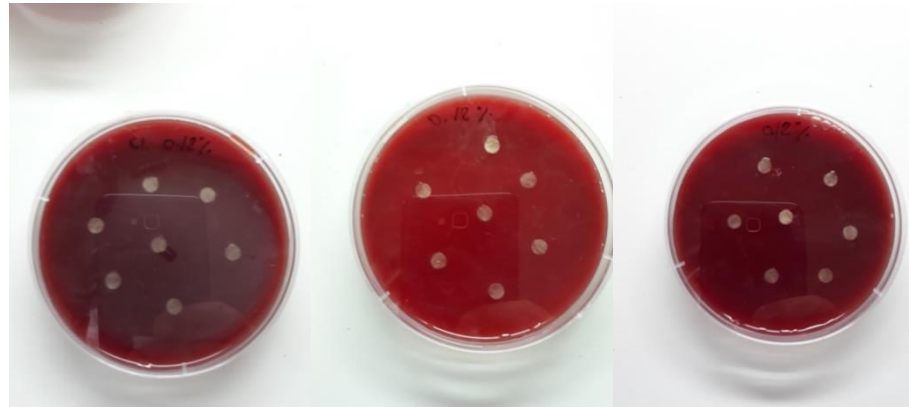
ANEXO14 I: Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 100% después de 48 horas de la incubación.



ANEXO 14 J: Medición de los halos de inhibición del Digluconato de clorhexidina 0,05% mas cloruro de Cetilpiridinio 0,05% después de 48 horas de incubación.



ANEXO 14 K: Medición de los halos de inhibición del Diguconato de clorhexidina 0,12% mas cloruro de Cetilpiridinio 0,05% después de 48 horas de incubación.



ANEXO 15: Resultados de los halos de inhibición.

"EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0,05 Y 0,12% MAS CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO"						
Muestra	H ₂ O bidestilada	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y halos de inhibición en mm			Digluconato de Clorhexidina al 0,05 mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05%. y halos de inhibición en mm	Digluconato de Clorhexidina al 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05%. y halos de inhibición en mm
Numero	Blanco	25%	50%	100%	CHX 0,05%	CHX 0,12 %
1	0	15	15	17	16	16
2	0	15	15	16	16	17
3	0	15	15	17	17	18
4	0	16	15	16	17	17
5	0	14	15	17	17	18
6	0	16	16	15	17	16
7	0	16	15	14	17	18
8	0	15	16	16	18	17
9	0	16	16	17	16	17
10	0	14	16	18	17	17
11	0	16	16	17	15	16
12	0	15	16	17	16	16
13	0	15	15	18	17	17
14	0	14	16	17	15	18
15	0	14	16	14	18	16
16	0	15	16	14	17	16
17	0	16	16	14	17	16
18	0	16	16	14	17	16
19	0	14	16	16	17	18
20	0	16	16	16	17	18
21	0	16	16	16	18	18

ANEXO 16 A: Ficha tecnica del *Streptococcus mutans* ATCC 25175



ATCC

Product Sheet

Streptococcus mutans

(ATCC® 25175™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: NCTC 10449 [IFO 13955]
Deposited Name: *Streptococcus mutans* Clarke
Product Description: Type strain

Propagation

Medium
ATCC® Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth

Growth Conditions
Temperature: 37°C
Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions or visit www.atcc.org for instructions.
2. Rehydrate the entire pellet with approximately 0.5 mL of #44 broth. Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #44 broth. Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary broth tube to these secondary tubes.
3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a #44 plate and/or #44 agar slant.
4. Incubate at 37°C for 24 to 48 hours.

Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

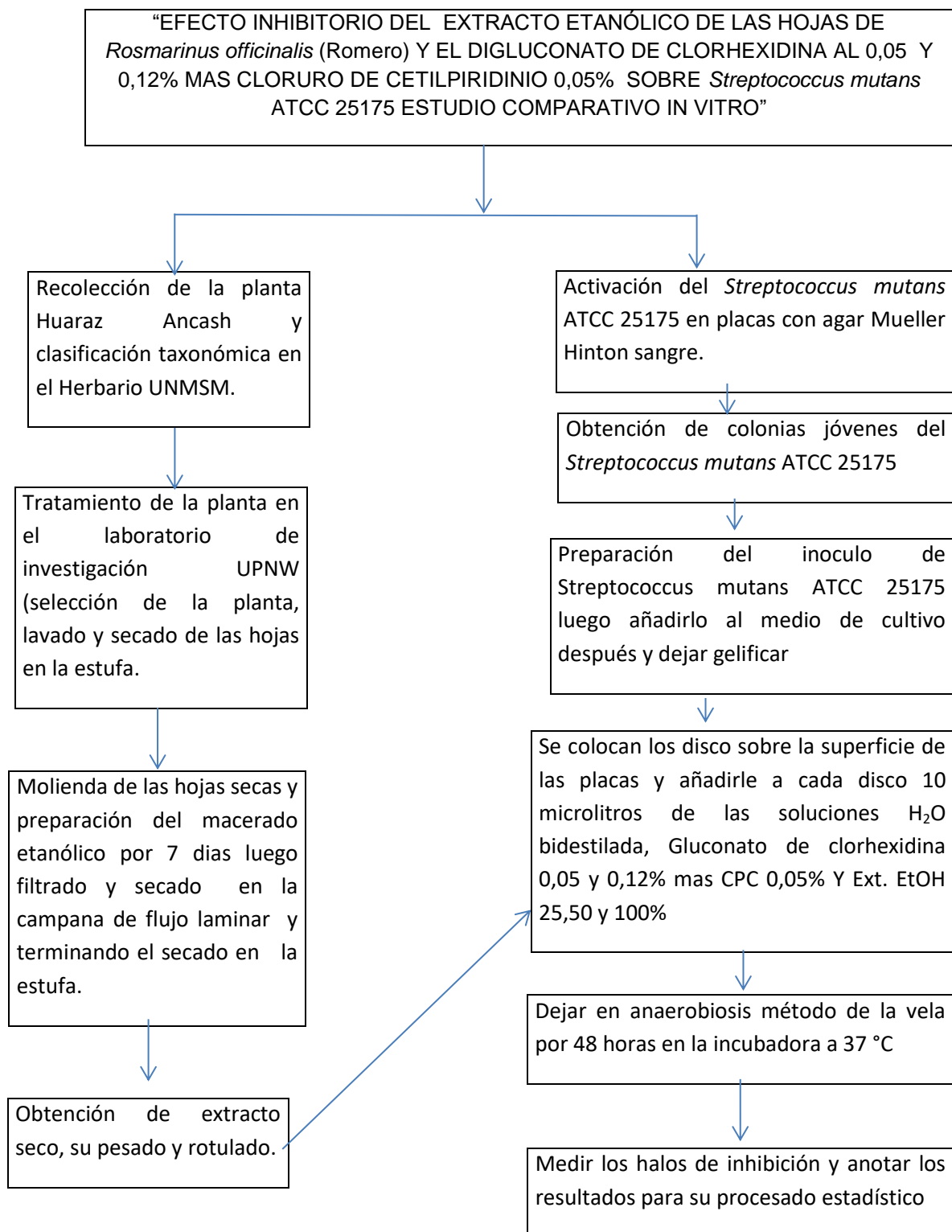
This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

ANEXO 17: Diagrama de actividades



ANEXO 18: Matriz de consistencia

		UNIVERSIDAD NORBERT WIENER FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD- EAP ODONTOLOGIA RUBRICA DE EVALUACIÓN DE LA MATRIZ DE CONSISTENCIA -TESIS				
BACHILLER: DOCENTE EVALUADOR :		León Romero, Agustín Félix Dra. Aguirre Morales, Anita Kori				
TITULO						
"EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) Y EL DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0,05 Y 0,12% MAS CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO"						
	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	METODOLOGIA	RESULTADO	CONCLUSIONES
Principal	¿Existe efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y el Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 estudio comparativo in vitro?	Comparar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y el Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 estudio comparativo in vitro.	El efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) es mayor que el del Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 estudio comparativo in vitro.	El presente estudio fue de tipo experimental in vitro, prospectivo y transversal	El extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> a la concentración de 100% presenta un diámetro promedio de 16,00 mm, seguido del extracto al 50% con 15,67 mm y el extracto al 25% con 15,19 mm. Los controles positivos de Digluconato de CHX 0,05 y 0,12% más CPC 0,05 tuvieron un promedio de 16,76 mm y 16,95 mm.	El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% presenta un efecto inhibitorio estadísticamente significativo sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (p valor menor a 0,05).
Específico 1	1. ¿Tendrá efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	1. Evaluar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	1. El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) a la concentración 25, 50 y 100% poseerá efecto inhibitorio sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	PLBLACION Y MUESTRA. Constituida por 126 unidades experimentales sobre placas con agar Mueller Hinton -sangra mas <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	Comparando el Digluconato CHX 0,12% mas CPC 0,05% con cada uno de nuestros tres extractos, nuevamente en este caso también el p valor para los extractos al 25 y 50% son menores a 0,05 lo cual indica que el efecto de estos dos extractos es inferior al el Digluconato 0,12 % mas CPC 0,05%, de manera análoga al realizar la comparación con el extracto al 100% concluimos que este tiene un efecto inhibitorio comparable al Digluconato clorhexidina 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (p valor mayor a 0,05).	1. El extr. etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) a la concentración de 100% presenta un efecto inhibitorio estadísticamente comparable al Digluconato de CHX 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> (S. mutans) ATCC 25175.
Específico 2	2. ¿Tendrá efecto inhibitorio del Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	2. Evaluar el efecto inhibitorio de Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	2. El Digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12% mas Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% tendrá efecto inhibitorio sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	MEDICION DEL HALO DE INHIBICION EN mm	El extr. EtOH de <i>Rosmarinus officinalis</i> a la concentración 25, 50 y 100% presenta un efecto inhibitorio muy sensible en la Escala de Duraffourd de igual manera las dos concentraciones de Digluconato de CHX 0,05 y 0,12% mas CPC 0,05%.	2. El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) a la concentración de 25 y 50% presenta efecto inhibitorio significativamente inferior al Digluconato de Clorhexidina 0,12% mas Cloruro Cetilpiridinio 0,05% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.

