



UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE
ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) FRENTE AL CRECIMIENTO DE
Streptococcus mutans ATCC 25175 *in vitro*. LIMA 2016”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DECIRUJANO DENTISTA
Presentado por:

AUTOR: CUEVA ROSALES, JAVIER
ASESOR: LIC. PAREJA CUADROS, ELIZABETH IRENE

LIMA – PERÚ
2017

Dedicatoria

A Dios por acompañarme siempre y ser mi guía.

A mis padres por su esfuerzo al educarme y darme su amor.

A mis hermanos por su incondicional apoyo.

Agradecimientos

A la Lic. Elizabeth Pareja Cuadros por su asesoría en la presente tesis y supervisión de los procedimientos realizados en el laboratorio de microbiología del departamento de microbiología de la Facultad de Medicina – Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A la Mg. Agustina Ramírez Torres, docente de la asignatura de Bioestadística de la Universidad Privada Norbert Wiener por su apoyo en el análisis estadístico del presente trabajo de investigación.

Asesor de tesis

LIC. ELIZABETH PAREJA CUADROS

Jurado

Presidenta: Mg. CD. Esp. Celia Aldazábal Martínez

Secretaria: Mg. CD. Esp. Ana Cecilia Cupé Araujo

Vocal: CD. Mariela Antonieta Villacorta Molina

ÍNDICE

SUMMARY	11
1.1. Planteamiento del problema	13
1.2. Formulación del problema	15
1.3. Justificación.....	15
1.4. Objetivo	16
1.4.1. General.....	16
1.4.2. Específicos	17
2. CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. Antecedentes	19
2.2. Base teórica	30
2.4. Hipótesis	63
2.5. Variables	64
2.6. Definición operacional de términos.....	65
3. CAPITULO III: DISEÑO Y MÉTODO.....	66
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	67
3.2. Población y muestra	67
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	67
3.4. Procesamiento y análisis de datos	70
3.5. Aspectos éticos	70
4. CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
4.1. Resultados	73
4.2. Discusión.....	77
5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	81
5.1. Conclusiones.....	82
5.2. Recomendaciones.....	83
ANEXOS.....	90
ANEXO N°1	90
ANEXO N°2	101
ANEXO N°3.....	102

ANEXO N°4	101
ANEXO N°5.....	102

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente a la cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> .	73
Tabla 2. Diámetro de los halos de inhibición del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente a cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 y 168 horas.	73
Gráfico 1. Efecto inhibidor del aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente a cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 y 168 horas.	74
Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición de la clorhexidina al 0.12% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 y 168 horas.	74
Gráfico.2 Efecto inhibidor de la clorhexidina al 0.12% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 y 168 horas.	75
Tabla 4. Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 y 168 horas.	75
Gráfico 3. Efecto inhibidor del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 horas.	76
Gráfico 4. Efecto inhibidor del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 168 horas.	76
Gráfico 5. Efecto inhibidor del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> a las 72 y 168 horas.	77

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue conocer la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “*in vitro*”. Para el análisis microbiológico se utilizó el aceite esencial de romero al 100% y se aplicó el método de agar en pozo; para ello, se prepararon 30 placas Petri con agar Muller Hinton; cada placa tenía un pozo de 6 mm de diámetro saturados con aceite esencial de romero y clorhexidina al 0.12 % (DENTODEX®). Las muestras se incubaron a 37°C, y fueron retiradas únicamente para medir y registrar los halos de inhibición bacteriana al cabo de 72 y 168 horas. El aceite esencial fue comparado con gluconato de clorhexidina al 0.12 % como control positivo para *Streptococcus mutans* ATCC 25175; como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Los datos fueron procesados en el programa SPSS y se aplicó la prueba estadística T – Student. Concluyéndose que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) mostró actividad antibacteriana “*in vitro*” en cultivos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 horas y que la clorhexidina al 0.12% tuvo una mayor actividad antibacteriana que el aceite esencial frente a esta cepa bacteriana a las 168 horas.

Palabras Claves: *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*, actividad antimicrobiana.

SUMMARY

The purpose of this research was to know the antimicrobial activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) against the growth of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro". For the microbiological analysis the essential oil of rosemary to 100% was used and the agar method was applied in well; for this, 30 Petri dishes were prepared with Muller Hinton agar; each plate had a 6 mm diameter well saturated with rosemary essential oil and 0.12% chlorhexidine (DENTODEX®). Samples were incubated at 37 ° C, and were removed only to measure and record bacterial inhibition halos after 72 and 168 hours. The essential oil was compared to 0.12% chlorhexidine gluconate as a positive control for *Streptococcus mutans* ATCC 25175; sterile distilled water was used as the negative control. The data were processed in the SPSS program and the T - Student statistical test was applied. In conclusion, *Rosmarinus officinalis* (rosemary) essential oil showed antibacterial activity "in vitro" in cultures of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 at 72 hours and that chlorhexidine at 0.12% had a higher antibacterial activity than the essential oil against this bacterial strain at 168 hours.

Keywords : *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*, antimicrobial activity.

1. CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La etiología multifactorial de la caries ha sido tema de diversas investigaciones que plantean que su desarrollo se debe, entre otras causas, a la presencia de microorganismos cariogénicos en la cavidad oral. *Streptococcus mutans* ha ocupado el interés de muchos investigadores; en 1890, W. Miller, propuso la teoría quimioparasitaria para explicar el fenómeno de la caries dental, relacionando microorganismos, carbohidratos de la dieta y enfermedad dental (1).

El *Streptococcus mutans* es sensible a varios antibacterianos utilizados en colutorios; como la clorhexidina y el triclosán. Estos se emplean preventivamente, en el tratamiento de pacientes con alto número de esta bacteria en la cavidad oral, con el propósito de reducir su número y evitar la generación de caries; de ellos, la clorhexidina, es el más utilizado, sin embargo, se conoce que su uso prolongado, produce efectos adversos en el organismo y en la estética oral (2).

La medicina tradicional fue usada desde la antigüedad, en la cual diversas plantas medicinales fueron utilizadas para alimentar, curar enfermedades, aliviar dolores, etc. Las propiedades curativas de las plantas se atribuyen a la presencia de un principio activo, el cual produce un efecto fisiológico, que están siendo estudiadas científicamente por investigadores, de forma multidisciplinaria, con la intervención de biólogos, químicos, farmacólogos y farmacognocistas. Un gran porcentaje de estos principios activos están comprendidos dentro de los productos naturales o metabolitos que son compuestos de estructura compleja y de distribución restringida, entre ellos: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, taninos, gomas, etc.; que pueden encontrarse distribuidas por toda la planta o en alguna de sus partes.

La flora peruana es muy rica en especies a la que la medicina tradicional atribuye eficaces propiedades terapéuticas, las que sin embargo aún no son investigadas (3), como es el caso del *Rosmarinus officinalis* conocida popularmente como romero, una especie originaria de la región mediterránea, rica fuente de metabolitos activos, esta planta es muy usada en la medicina tradicional por sus efectos digestivos, antiespasmódicos y carminativos (4). Generalmente se encuentra de forma silvestre en zonas rocosas y arenosas cercanas al mar pero debido a su adaptabilidad y poca exigencia para cultivarse se reproduce con facilidad en otras zonas. El romero pertenece a la familia Lamiaceae (Labiatae *Labiadas*), es una planta arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados (5).

El aceite esencial obtenido de sus hojas es considerado como un antimicrobiano natural que puede ser utilizado en la producción de nuevos agentes con actividad antimicrobiana para la industria farmacéutica y alimentaria. Su actividad contra algunas cepas patógenas ha sido reportada por varios autores. Se han realizado estudios *in vitro* con extractos de *Rosmarinus officinalis* (romero) en los que se ha evaluado su actividad contra bacterias Gram positivas y Gram Negativas (4).

Del mismo modo su aceite esencial podría usarse en la prevención y tratamiento de la patología más frecuente de la cavidad bucal; la caries dental. Por ello se realiza el presente estudio a fin de probar las propiedades antibacterianas del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*.

1.2. Formulación del problema

¿Cuál es la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*. Lima 2016?

1.3. Justificación

En la actualidad, las plantas medicinales están recuperando parte del protagonismo que tuvieron en los primeros tratamientos médicos, se percibe un nuevo auge de sus aplicaciones terapéuticas. La eficacia de algunos principios activos de origen natural ha quedado demostrada, como es el caso de la acción vasodilatadora del *Ginkgo biloba*. La medicina natural aunque ha sido utilizada como tratamiento médico general desde hace muchos años, es muy poco conocida como posible aporte al ámbito odontológico. Al respecto, existen investigaciones para estudiar el comportamiento de ciertos compuestos de origen vegetal sobre la bacteria más importante en la iniciación de la caries, el *Streptococcus mutans*; entre las que se pueden señalar las realizadas con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* "Te verde"; con la *Matricaria recutita* "Manzanilla alemana" como irrigante endodóntico; varios aceites esenciales solos y/o combinados con la clorhexidina sobre cultivos bacterianos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la necesidad de incorporar a la salud pública los recursos y técnicas de la medicina tradicional. Así el medicamento tradicional puede contribuir a la solución del problema de salud bucal en poblaciones

rurales, así como aliviar el alto costo y difícil adquisición de medicamentos hechos a base de insumos químicos.

Ha surgido de esta forma la necesidad de lograr sustancias antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans* que puedan ser utilizadas como enjuagues bucales y sin tales efectos colaterales. Las plantas y sus propiedades antibacterianas, son una alternativa válida; sus productos naturales no son tóxicos, tienen menos efectos secundarios que las drogas sintéticas, y son accesibles a precios asequibles.

Los múltiples beneficios médicos del romero son bien conocidos; pero su posible uso como antibacteriano sobre la principal bacteria implicada en la formación de placa dentobacteriana, no reúne mayores referencias; he allí donde se pretende consolidar este aporte a la investigación y por ende al medio odontológico. Dada la escasez de investigaciones científicas en el área temática, fortalece el valor del trabajo propuesto. De esta manera, la presente investigación podrá brindar una alternativa de elección en la inhibición de placa dentobacteriana y por consiguiente una alternativa en la prevención y tratamiento de la patología más frecuente de la cavidad oral.

1.4. Objetivo

1.4.1. General

- Determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “*in vitro*”.

1.4.2. Específicos

- Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) al 100% frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “*in vitro*” a las 72 y 168 horas.
- Determinar la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12 % frente al crecimiento al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “*in vitro*” a las 72 y 168 horas.
- Comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) al 100% con gluconato de clorhexidina al 0.12 % frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en estudio “*in vitro*” a las 72 y 168 horas.

2. CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Rocha R (2016) Realizó un estudio experimental con el propósito de determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, el cual se realizó en las concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75% y 100%; empleando el método de difusión de discos; en los cuales todos los discos presentaron halo de inhibición, y los tamaños de éstos aumentaron directamente proporcional a las concentraciones utilizadas. Para hallar MIC, se empleó el Método de dilución en tubos; de cada cultivo se sembraron en Agar Muller Hinton – Sangre, para determinar las UFC; en tanto que, las 5 concentraciones de aceite esencial de romero presentaron efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans*, así mismo se halló la concentración mínima inhibitoria en aceite esencial de romero al 75%; concluyéndose que tanto el aceite esencial de romero a las concentraciones mencionadas poseen actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans*. (6)

Solano X., Moya T., Zambrano M. (2016) Estudiaron el *Rosmarinus officinalis* con el objetivo de determinar la inhibición de crecimiento bacteriano *in vitro* de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de sus extractos acuoso y oleoso. El estudio experimental evaluó la acción antimicrobiana frente al *S. mutans* ATCC 25175 a través de técnica microbiológica de difusión de discos en medio sólido; para ello se utilizó dos grupos de 15 muestras cada una en placas Petri; siendo G1: Extracto acuoso de 1.5% y 3%, G2: Extracto oleoso 50%. Cada uno de los grupos tuvo un

control positivo de Clorhexidina 0.12% y un control negativo de agua destilada. Se aplicó el test estadístico de U Mann Whitney con un nivel de significancia de 5%.

Los extractos acuosos y el agua destilada produjeron un halo de inhibición de 0 mm. El extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93 mm de halo de inhibición ($p < 0.001$), versus la Clorhexidina que presentó una media de 16.13 mm ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias entre el extracto oleoso y la clorhexidina ($p > 0.05$). Concluyéndose que el extracto acuoso de romero no mostró efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*. El extracto oleoso de romero mostró acción antibacteriana sobre *S. mutans*, siendo similar a la clorhexidina. (7)

Tacca J., Macedo S., Aquino M. (2014) Realizaron un estudio con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a los microorganismos de la placa bacteriana. Para ello se compararon el diámetro de los halos inhibitorios del *Rosmarinus officinalis* (grupo experimental), Digluconato de clorhexidina 2% (control positivo) y el agua destilada (control negativo) frente al *Streptococcus viridans*, *Actinomyces sp* y *Lactobacillus spp*. Al realizar las pruebas de sensibilidad, los diámetros de los halos de inhibición obtenidos del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis*, del Digluconato de clorhexidina 2% y del agua destilada; se compararon el efecto antibacteriano del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* con la de la Digluconato de clorhexidina 2% frente a las 3 cepas bacterianas estudiadas: obteniéndose como resultado que el Digluconato de clorhexidina 2% tiene mayor efecto frente al *S. viridans*, *Actinomyces sp*, pero ambas sustancias tienen estadísticamente igual efecto frente al

Lactobacillus spp. Concluyéndose que el aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano in vitro frente las tres especies de bacterias estudiadas.
(8)

Rondón (2013) Evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. Para ello, la planta *Rosmarinus officinalis* se recolectó en el distrito de Calana, durante el mes de agosto. Para la extracción del aceite esencial, se empleó las hojas y se realizó por arrastre a vapor. Las cepas utilizadas para este ensayo fueron: *Escherichia coli* ATTC 11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La actividad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de esta planta se puso de manifiesto utilizando el método de difusión del disco (Kirby Bauer), con cuatro repeticiones a diferentes concentraciones, obteniéndose de esta manera la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Los resultados para la difusión en disco fue para el caso de *Escherichia coli* ATTC 11225 en el tratamiento T3 con una sensibilidad promedio de 11,5 mm; a partir de ello todo los demás tratamientos fueron sensibles. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue en el tratamiento T2 con una sensibilidad promedio de 11,0 mm y a partir de ello todos fueron sensibles. Los resultados del MIC fue en el caso de *Escherichia coli* ATTC 11225 de 6,83 mg/mL, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 9,50 mg/mL. Además la CMB fue para *Escherichia coli* ATTC 11225 de 7,12 mg/mL, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 10,09 mg/mL en la que hay una inhibición total del crecimiento bacteriano. Se concluye que el aceite

esencial de *Rosmarinus officinalis* presentó compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, con efecto antimicrobiana *in vitro* frente a *E. coli* ATTC 11225 y *S. aureus* ATCC 25923. (9)

Mostacero I *et al.* (2013) Estudiaron el efecto inhibitorio de la infusión del *Rosmarinus officinalis* (romero) frente al crecimiento del *Streptococcus mutans*, con el fin de controlar procesos cariogénicos y formación de placa bacteriana en la cavidad oral. Para ello, se enfrentó la suspensión bacteriana de 3×10^7 UFC/mL a 3 concentraciones de infusión de romero: 10%, 20% y 40% durante 0, 1 y 5 minutos respectivamente, realizado *in vitro*; se empleó el método de siembra en superficie para contabilizar las UFC/mL sobrevivientes al efecto inhibitorio. La evaluación se basó en la comparación de los recuentos obtenidos en los ensayos problema con el control, efectuándose tres repeticiones para cada ensayo. Los recuentos obtenidos en cada repetición se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) y análisis de diferencia significativa (Games-Howerd). Como resultado se obtuvo que para el *Streptococcus mutans*, la infusión de *Rosmarinus officinalis* al 40% presentó 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 que al 20% se obtuvo una media de 2016666,67 y tanto a 1 minuto como a los 5 minutos mostró una diferencia significativa de 0,0002 respecto al ensayo control. Concluyendo que a mayor concentración y tiempo de exposición de la infusión de *Rosmarinus officinalis*, mayor es el efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*. (10)

San Román I (2013) Realizó un estudio con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) *in vitro* sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, tomando como control positivo a la clorhexidina 0,12%. Se seleccionaron 24 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, que acudieron a atenderse en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se procedió a tomar la muestra con conos de papel número 30 se colocó dentro del saco periodontal durante 30 segundos, luego se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Se utilizó el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó en condiciones de anaerobiosis, por 48 h a 37 °C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. De los resultados se comprobó que existe igual actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a una concentración de 75 mg/mL con la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. (11)

Teixeira L (2012) Realizó un estudio con el objetivo de determinar, *in vivo*, la acción antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre las bacterias orales presentes en biofilm dental que se asocian con caries y enfermedad periodontal. Para ello, se realizó un estudio con 11 voluntarios que realizaron tres tratamientos; realizados en tres fases de 14 días cada uno. Durante esas semanas, los voluntarios se realizaron enjuague bucal con las siguientes soluciones: control negativo / placebo; solución de clorhexidina al 0,12% (estándar) y una solución que contiene

extracto de hoja de *Rosmarinus officinalis* (solución de ensayo). El índice de higiene oral simplificado se utilizó para determinar la interferencia de las soluciones en la biopelícula dental de voluntarios. Los datos clínicos y estadísticos muestran que el extracto de Romero aparentemente no presentó grandes resultados, no desempeñando la acción deseada en la concentración probada. Como era de esperar, la clorhexidina mostró mejores resultados en el control de la biopelícula dental. Teniendo en cuenta los pre - estudios existentes, esta investigación sugiere que la acción del extracto de Romero puede tener resultados significativos en otras concentraciones, no descartando así la posible acción antibacteriana de la planta estudiada. (12)

Dalirsani *et al.* (2011) Estudiaron los efectos antimicrobianos de diez extractos de plantas medicinales frente al crecimiento de *Streptococcus mutans*. Se compararon con clorhexidina 30 g de diez plantas, incluyendo tomillo, menta, ajo, canela, manzanilla, árbol de té, clavo, menta verde, salvia, romero y se disolvieron en 100 mL de metanol puro y se colocaron en un agitador durante 48 h. Entonces, después de pasar la solución a través de un filtro, que se pusieron en una incubadora a 37° C durante 48 h, el *Streptococcus mutans* se cultivó en agar sangre. Se utilizaron como controles positivos discos de clorhexidina, mientras que los discos de metanol y en blanco se utilizaron como controles negativos. Después de 24 h se midieron los diámetros de los halos indicativos de falta de crecimiento en cada disco con un par de pinzas. Los diámetros de la zona alrededor de cada disco se compararon con

clorhexidina usando análisis de la prueba T. La zona inhibitoria se observó alrededor de los discos de extracto de Romero.

El Romero se encontró como una planta antimicrobiana potente, sugiriéndose más estudios para la producción de colutorios a base de plantas medicinales. (13)

Ávila - Sosa *et al.* (2011) Realizaron una revisión bibliográfica de los usos no culinarios del *Rosmarinus officinalis* (Romero), con el objetivo de revisar el estado del arte del Romero desde el punto de vista científico obtenido de las principales publicaciones. Esta revisión contiene entre sus puntos principales el análisis químico de los principales componentes del Romero, su capacidad antioxidante, sus principales efectos terapéuticos y aplicaciones medicinales, el uso de los diversos extractos de romero en la industria de alimentos así como sus principales efectos toxicológicos; concluyendo que el valor de utilizar el Romero con fines no culinarios depende, además de su riqueza en principios activos, de la rareza con la que se encuentran en la naturaleza y de las dificultades para su extracción (5).

Minaiyan *et al.* (2011) Estudiaron el Romero con el objetivo de evaluar los efectos del extracto hidroalcohólico y aceite esencial obtenidas de las hojas de romero en un modelo bien definido de la colitis experimental inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratas; para ello, emplearon diferentes dosis de extracto hidroalcohólico (100, 200, y 400 mg/kg) y del aceite esencial (100, 200, y 400 μ L/kg), que se administraron por vía oral y por vía intraperitoneal, respectivamente (100, 400 mg / kg y 100, 400 μ L/kg) a ratas Wistar macho, 6 horas

después de la inducción de la colitis y se continúa durante 5 días por instilación intracolónica de 0.25 mL de TNBS (80 mg/kg) / etanol al 50 % v/v. Se midió la relación peso / longitud del colon en húmedo, así como los índices de colitis se evaluaron tanto macroscópicamente e histopatológicamente. El extracto hidroalcohólico y los aceites esenciales en todas las dosis de ensayo utilizados fueron eficaces para reducir lesiones de los tejidos del colon y los índices colitis, mientras que mayores dosis fueron significativamente eficaces para disminuir los parámetros histopatológicos con independencia de la vía de administración.

La administración de prednisolona oral y acetato de hidrocortisona parenteral fueron eficaces para reducir también las lesiones del tejido del colon. Estos datos sugieren que el extracto hidroalcohólico y los aceites esenciales son efectivos y que poseen actividad anticolitis ulcerosa; y reforzar el uso de esta planta como un remedio para las enfermedades intestinales inflamatorias en la medicina tradicional. (14)

Bernardes *et al.* (2010) Estudiaron el Romero con el objetivo de determinar la actividad inhibidora in vitro de extractos hidroalcohólicos de las hojas y tallos de *Rosmarinus officinalis*, para ello se evaluó los extractos hidroalcohólicos frente a los siguientes microorganismos responsables de iniciar la caries dental: *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, y *Enterococcus faecalis*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron con el método de microdilución en caldo. El fraccionamiento guiado por bioensayo del extracto de la hoja, que muestra la actividad antibacteriana más alta que el extracto de tallo, condujo a la identificación del ácido carnósico y el carnosol como los principales

compuestos en la fracción que muestra la actividad más alta, tal como se identifica por análisis de HPLC. El ácido rosmarínico, detectado en otra fracción, no muestra ninguna actividad contra los microorganismos seleccionados. El análisis HPLC reveló la presencia de bajas cantidades de ácido ursólico y ácido oleanólico en las fracciones obtenidas.

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de *Rosmarinus officinalis* puede atribuirse principalmente a la acción del ácido carnósico y el carnosol (15)

Castaño *et al.* (2010) Estudiaron el Romero con el objetivo de evaluar la actividad bactericida y de determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. El aceite esencial exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas con CIM entre 512 – 4096 ppm. El extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con CIM de 1024 ppm. La nisina, utilizada como control positivo, ocasionó una inhibición del crecimiento de todas las bacterias evaluadas con concentraciones mínimas inhibitorias entre 2 y 1024 ppm, mientras que los conservantes usados comúnmente en la industria de alimentos presentaron una actividad antimicrobiana menor que la encontrada con el aceite esencial de

Rosmarinus officinalis; concluyéndose que las hojas de Romero (*Rosmarinus officinalis*) contienen compuestos con clara actividad antimicrobiana sobre microorganismos de importancia en contaminaciones alimentarias, con un mayor espectro de acción el aceite esencial, que el extracto etanólico de la hoja (4).

Rozman y Jersek (2009) Estudiaron el Romero con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Rosmarinus officinalis* (romero) contra diferentes especies de *Listeria* y contra diferentes cepas de *L. monocytogenes*; para ello se utilizaron dos marcas registradas de extractos de romero, Vivox 20 y Vivox 40, que contiene diferentes niveles de ácido carnósico. Querían probar la actividad antimicrobiana de extractos seleccionados de romero; con 2 métodos más utilizados: el método de difusión en disco y el método de dilución en caldo. Con el método de difusión en disco se obtuvieron zonas de inhibición y en las concentraciones más bajas, donde se registró ningún crecimiento bacteriano visible, se asumieron como valores de concentración mínima inhibitoria (MIC). Se determinaron los valores de CMI en los rangos de extracto de 625 µg extracto / mL de etanol a 5,000 µg extracto / mL de etanol para Vivox 20 y desde 312.5 µg extracto /mL de etanol a 2500 µg extracto /mL de etanol para Vivox 40 en el medio. Establecieron que la resistencia de las especies de *Listeria* contra extractos de Romero depende de: extracto seleccionado, la concentración seleccionada, varias especies y la tensión de *Listeria*. Con el método de dilución en caldo, determinaron la concentración bactericida mínima (MBC), como la concentración que da 0,1% de supervivencia bacteriana. Con este método, probaron dos cepas de *L. monocytogenes* y en CBM valores

determinados en el intervalo de 15,63 µg/mL de TSB a 98,5 µg/mL de TSB para ambos extractos ensayados. Los resultados obtenidos confirmaron que la resistencia de la *Listeria* contra extractos de romero dependía de la cepa seleccionada, concluyéndose que ambos extractos Vivox 20 y Vivox 40 tuvieron una buena actividad antimicrobiana contra varias cepas de *Listeria*. (16)

Silva M *et al.* (2008) Estudiaron el Romero con el objetivo de investigar la actividad antimicrobiana y la inhibición de la adhesión en el extracto *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* (Romero) en cepas estándar de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, ATCC 10556 *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 y *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Los ensayos se realizaron por las técnicas de difusión en agar en placas de Petri para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la técnica de tubos inclinados para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de Adherencia (CIMA) para vidrio en presencia de 5% de sacarosa. Los mismos procedimientos se realizaron con 0,12% de clorhexidina. Las MICs (mg/mL) del extracto de *Rosmarinus officinalis* sobre *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 27609 y *L. casei* ATCC 7469 eran 1:01, 1:04, 1:01 y 1:04, respectivamente; no hubo inhibición de crecimiento de *S. mitis* ATCC 98811. Las CIMAs del extracto de *Rosmarinus officinalis* contra *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 y *S. sobrinus* ATCC 27609 eran 1:08, 1:16, 1:08, respectivamente. Los resultados sugieren la posibilidad del uso de extracto de Romero como un antimicrobiano oral. Sin embargo, los modelos de estudio que las que se pueden reproducir situaciones similares a las que se

encuentran en la cavidad oral se requieren para la evaluación de los agentes antimicrobianos en el tratamiento y la prevención de las infecciones orales biopelícula dependientes (17).

2.2. Base teórica

2.2.1 *Streptococcus mutans*

2.2.1.1 Generalidades

Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades. El concepto actual contempla que varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental (estreptococos del grupo mutans, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*) de los cuales, *Streptococcus mutans* es el agente más importante asociado a ella. (18)

La formación de la biopelícula dental y su sistema de quórum sensing son fundamentales en la vida del *Streptococcus mutans*. La superficie dental es un hábitat natural indispensable para *Streptococcus mutans* y el tropismo por la biopelícula dental se refleja por su adaptación a sintetizar glucanos, fijar compuestos y a adaptar su aciduricidad. (18)

Streptococcus mutans produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso,

disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización. (18)

Los *Streptococcus* del grupo *mutans* han sido estudiados usando pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares que incluyen hibridación ADN-ADN y secuenciación de genes ARN ribosomales. Las especies más importantes en el humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa. (18)

Del gran número de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal, los microorganismos pertenecientes al género Estreptococo, básicamente las especies *mutans* (con sus serotipos c, e y f), *sanguis*, *sobrinus* y *crictetus*, han sido asociados a la caries, tanto en animales de experimentación como en humanos. Se conoce que los causantes principales de las caries son los *Streptococcus* del grupo *mutans*, asociados con otras bacterias que pueden modificar el desarrollo de las lesiones. El *Streptococcus mutans*, que ha sido el más aislado en lesiones cariosas humanas, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe de su tendencia a cambiar de forma, y se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo. (19)

2.2.1.2 Morfología y características en cultivo

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco. (18)

Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. *Streptococcus mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *Streptococcus mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *Streptococcus mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación. (18)

2.2.1.3 Factores de virulencia

Cuando se habla de virulencia de un microorganismo, se está haciendo referencia a su capacidad de producir daño, es decir, generar una enfermedad. Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microbio

que lo hacen patógeno. En el caso del *Streptococcus mutans*, los más involucrados en la producción de caries son:

1. Acidogenicidad: el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.

2. Aciduricidad: es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.

3. Acidofilicidad: el *Streptococcus mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H^+) fuera de la célula.

4. Síntesis de glucanos y fructanos: por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.

5. Síntesis de polisacáridos intracelulares, como el glucógeno: sirven como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos períodos aún en ausencia de consumo de azúcar.

6. Producción de dextranasa: además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano. (20)

2.2.1.4 Recursos metabólicos

La bacteria obtiene su energía del alimento que ingerimos, su flexibilidad genética le permite romper toda una amplia gama de hidratos de carbono. Entre las sustancias que aprovecha figuran la glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, maltosa, rafinosa,

ribulosa, melibiosa e incluso el almidón. La bacteria fermenta todos estos compuestos al disponer de un batallón de enzimas, proteínas que rompen las moléculas de hidratos de carbono, y los convierte en varios subproductos de su metabolismo, como el etanol o el ácido láctico. A la postre, todos estos subproductos acidifican la boca y los dientes, lo que inhibe a las otras bacterias, permitiendo al estreptococo mantener una posición de claro dominio. El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial del *Streptococcus mutans* a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo (PAc) y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental, y la capacidad de acumulación en la placa, proceso que ocurre cuando el *Streptococcus mutans* produce glucanos solubles e insolubles utilizando las enzimas glucosiltransferasas (GTF), a partir de los azúcares de la dieta. El grado de infección por el *Streptococcus mutans* en la saliva nos refleja el grado de infección existente en los dientes, en un sentido muy general. (20)

2.2.1.5 Sustrato cariogénico

Dentro de los factores que favorecen el desarrollo de la caries dental, uno de los más estudiados es el consumo excesivo de azúcares simples. Numerosos estudios han demostrado la asociación entre caries y carbohidratos refinados o azúcares, especialmente, la sacarosa. Los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microflora bucal y dan inicio al proceso de cariogénesis. (21)

La sacarosa, formada por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; se considera el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino

porque el *Streptococcus mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa. (21)

2.2.1.6 Detección de *Streptococcus mutans* cariogénicos

Actualmente el recuento de *Streptococcus mutans* se usa como ayuda diagnóstica para seleccionar grupos de pacientes con riesgo de caries (18) y monitorear el nivel de colonización de un individuo (20). Recuentos superiores a 100000 UFC/mL de *Streptococcus* en saliva, se consideran indicadores de riesgo de caries, y recuentos salivales más bajos concuerdan con una tendencia mínima a contraer esta enfermedad. Los altos grados de infección por *Streptococcus mutans* ($>10^6$ UFC $\cdot >10^5$ mL/saliva), significan elevado riesgo de caries y de transmisión del microorganismo. (20)

Se han establecido diferentes metodologías para la detección de cepas potencialmente cariogénicas de *Streptococcus mutans*. Uno de ellos es la identificación mediante la detección de mutacinas (bacteriocinas), ya que se considera que la producción de mutacinas está relacionada con la capacidad para producir caries, y se utilizan además como un marcador epidemiológico para establecer la fuente de infección y el mecanismo de transmisión, debido a que predomina un tipo productor de bacteriocinas en un individuo de la misma forma. (20)

En adición al anterior existen métodos para la identificación de genes de *Streptococcus mutans*, involucrados en la síntesis de polisacáridos extracelulares como los genes gtfB y gtfC de la glucosiltransferasa-I y glucosiltransferasa-SI

respectivamente y gtfD para la enzima glucosiltransferasa-S, e identificar a las bacterias potencialmente cariogénicas con una alta especificidad. (22)

También se han descrito pruebas más sencillas utilizando un palillo de dientes para tomar una muestra de placa dental y transferir la muestra a medios selectivos o mediante la utilización de un abatelenguas. (22)

2.2.1.7 Medios de cultivo

No existe un solo método de cultivo para examinar la variable y compleja placa dental que satisfaga todas las condiciones necesarias. En algunos casos se requieren procedimientos estrictamente anaeróbicos. Afortunadamente, muchas de las especies de estreptococos orales pueden aislarse de varios sitios usando medios selectivos como el Agar Mitis Salivarius (MS). Aunque el Agar MS fue originalmente desarrollado para aislar *Streptococcus fecales*, su uso ha predominado sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus* orales, incluyendo *Streptococcus mutans*. En el agar MS, muchos *Streptococcus* orales muestran una morfología característica de las colonias (blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo) lo cual permite su diferenciación inicial. Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmósfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días seguida de una incubación en aire por 1 o 2 días. Además de la morfología característica de las colonias, los *Streptococcus* orales pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa. El cultivo en agar es considerado como el estándar de oro ya que permite

realizar recuentos bacterianos para establecer proporciones relativas, mediante métodos cuantitativos en medios no selectivos. (18)

Actualmente hay 5 medios de cultivo diferentes para el aislamiento de *Streptococcus mutans*. Estos son: Agar Mitis salivarius con bacitracina (MSB), Agar Mitis Salivarius con bacitracina y kanamicina (MSKB) Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina (GSTB) Agar Tripticasa de soya con sacarosa y bacitracina (TYS20B) y Agar triptona extracto de levadura cisteína con sacarosa y bacitracina (TYCSB). El agar MS es el medio más ampliamente usado para aislar *Streptococcus mutans* y otras especies orales de *Streptococcus*. El agar MS ha sido modificado para ser más selectivo en el aislamiento de *Streptococcus mutans* adicionando tanto sulfonamida (Agar MC), bacitracina (Agar MSB), polimixina o aun sacarosa (MS40S). Los métodos de recuento de colonias permiten determinar el grado de colonización producida por *Streptococcus mutans* según las edades, siendo de gran utilidad para identificar la población de alto riesgo de caries dentales y su aplicación permitiría desarrollar programas de prevención en salud oral en poblaciones específicas y vulnerables. (18)

2.2.1.8 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 k. (18)

Los polisacáridos de la pared celular juegan un papel importante en la colonización de sus nichos ecológicos. Las diferencias en las afinidades para la unión de los antígenos de polisacáridos a los tejidos humanos pueden ser la causa de esta distribución tan variada. Por otro lado, se cree que el progenitor de *Streptococcus mutans* haya sido el serotipo c y que las cepas f y e pueden haberse originado por mutaciones del determinante del serotipo c. *Streptococcus mutans* generalmente es conocido como patógeno dental e igualmente se considera que causa bacteremia y endocarditis infecciosa. Previamente se ha clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Recientemente se designó una cepa de *Streptococcus mutans* con serotipo no c/e/f como serotipo k el cual se caracteriza por una drástica reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa. Un rasgo biológico común del serotipo k es su bajo nivel de cariogenicidad debido a las alteraciones de varios de los mayores antígenos proteicos de superficie. (18)

En cuanto a la virulencia en sangre, estas cepas sobreviven en la sangre por mayor tiempo debido a su baja antigenicidad. Otros estudios revelan la participación de este serotipo en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, en la cuales se ha detectado su alta frecuencia. (18)

2.2.1.9 Transmisión, Colonización y estabilidad de *Streptococcus mutans* en cavidad oral

La caries dental es una enfermedad dental transmisible en la cual los *Streptococcus* del grupo *mutans* juegan un papel principal. Como en muchas enfermedades infecciosas, se requiere la colonización de un patógeno antes de que ocurra la infección. Hay un rango de factores de virulencia importante para el establecimiento de *Streptococcus mutans* en la compleja comunidad microbiana de la biopelícula dental. Estudiar los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* y su correlación con la biodiversidad de especies es fundamental para entender el papel que juega en la colonización por los diferentes genotipos en el mismo individuo y la expresión de las características que puedan o no influenciar su capacidad de virulencia y su habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales. El papel de los *Streptococcus* del grupo *mutans*, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en la etiología de la caries dental ha sido extensamente investigado y claramente demostrado. (18)

La evidencia indica que una forma importante de transmisión de *Streptococcus mutans* durante los primeros años de vida es la que se produce de madre a hijo por contacto directo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos el padre, los hermanos y demás posibles cuidadores constituye otra vía de transmisión (transmisión horizontal) que cobra importancia durante edades posteriores. (23)

Una característica importante de *Streptococcus mutans* es la persistencia de sus genotipos en la cavidad oral de adultos, adolescentes y niños mayores de 5 años.

(23)

Este fenómeno es conocido como persistencia “intraindividual” y revela la relativa estabilidad que estos alcanzan en un hospedador y la relación con la expresión de características fenotípicas que les pueden dar ventajas para la supervivencia, como la capacidad de formar biopelículas, de adherirse y soportar fluctuaciones del pH. Se ha considerado comúnmente que la colonización de la cavidad oral de los niños por *Streptococcus mutans* (“ventana” de infección) ocurre al producirse la erupción del primer diente, es decir, alrededor de los seis meses de edad. Sin embargo, es lógico pensar que en niños expuestos a factores que facilitan los procesos de transmisión, la colonización se produzca antes de la aparición de los primeros dientes. Hay dos factores que sugieren que *Streptococcus mutans* pueda aparecer durante la etapa pre dental: 1) *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son capaces de colonizar superficies mucosas. 2) Algunos niños desarrollan lesiones de caries poco después de la erupción dental. La colonización temprana de la cavidad oral (antes de la erupción dental) por *Streptococcus mutans* puede aumentar el riesgo de caries y hacer que su desarrollo se produzca a edades más tempranas. (23)

Se han identificado unos 52 genotipos diferentes en niños pero las madres transmiten cerca de 16 de ellos. Se observa una tendencia hacia la estabilidad de los genotipos transmitidos por las madres, en parte, porque la colonización del genotipo materno pueda interferir con la colonización de otros genotipos. Se ha observado que los niños albergan de uno a cinco genotipos diferentes de *Streptococcus mutans* en

diferentes edades. La diversidad genotípica de *Streptococcus mutans* en cuatro sitios de muestreo (saliva, dorso de la lengua, mucosa alveolar y biopelícula dental) de niños parece ser homogénea, sin embargo, la biopelícula dental es un lugar muy importante dado el gran número de genotipos de *Streptococcus mutans* y las cepas aisladas. Se ha demostrado un alto grado de homología entre cepas de *Streptococcus mutans* recuperadas de miembros de la misma familia indicando tanto la transmisión vertical y horizontal y una persistente colonización de *Streptococcus mutans* adquiridos previamente hasta la adultez temprana. (18)

La colonización inicial por *Streptococcus mutans* fue investigada en un estudio prospectivo de 46 niños estadounidenses desde el nacimiento a 5 años de la edad cuyas madres portaban altos niveles de *Streptococcus mutans*. De aquel estudio, la ventana de infectividad fue definida como el período a partir de 19 a 31 meses de edad, cuando el riesgo de adquisición de *Streptococcus mutans* era alto. (18)

2.2.1.10 Adherencia de *Streptococcus mutans* y desarrollo inicial de la caries

Las cepas de *Streptococcus mutans* son fenotípicamente homogéneas. Sin embargo, recientes investigaciones han revelado un gran nivel de la heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *Streptococcus mutans*. La heterogeneidad también se observa a nivel de enzimas producidas por las diferentes especies de *Streptococcus mutans* tales como las deshidrogenasas, glucosiltransferasas, aldolasas e invertasas. La serotipificación es un procedimiento rutinario y de mucho valor para determinar otros grupos inmunológicos y tipos de *Streptococcus*. (18)

Se ha aceptado que las glucosiltransferasas (Gtfs) de *Streptococcus mutans* desempeñan papeles críticos en el desarrollo de la placa dental virulenta. Las Gtfs se adsorben para producir glucanos in situ sobre el esmalte, proporcionando los sitios para la colonización ávida por microorganismos y una matriz insoluble para la formación de la placa. (18)

Las Gtfs también se adsorben a las superficies de otros microorganismos orales convirtiéndolos en productores de glucanos. *Streptococcus mutans* expresa 3 Gtfs genéticamente distintas; cada una parece desempeñar un papel diferente pero que se superpone en su papel en la formación de la placa virulenta. GtfC se adsorbe dentro de la película mientras que la GtfB se liga ávidamente a las bacterias promoviendo una apretada fusión celular incrementando la cohesión de la placa. (16)

La GtfD forma un polisacárido soluble, fácilmente metabolizable y sirve de iniciador de la GtfB. El comportamiento de Gtfs solubles no refleja lo observado con enzimas adsorbidas en la superficie. Además, la estructura de la matriz de polisacárido cambia con el tiempo a consecuencia de la acción de mutanasas y dextranasas dentro de la placa. Las Gtfs en diferentes lugares ofrecen blancos quimioterapéuticos para prevenir la caries dental. (18)

Sin embargo, los agentes que inhiben las Gtfs en solución, con frecuencia tienen efecto reducido o ninguno sobre las enzimas adsorbidas. Se han identificado otros productos bacterianos solubles usando técnicas inmunológicas, entre otros, fructosiltransferasa, Glucosiltransferasa (Gtf) y ácido lipoteicoico en la película formada in vitro e in vivo a partir de saliva entera. Se ha observado que las enzimas cuando se insolubilizan permanecen muy activas en una amplia gama de valores de

pH. Está claro que la presencia de Gtf activa dentro de la película dental facilita la formación de glucanos in situ, proporcionando así, distintos sitios de unión para los microorganismos orales. (18)

2.2.1.11 Coagregación

Streptococcus mutans tiene la capacidad de adherirse a superficies, establecer uniones con otros estreptococos y con bacterias de otras especies. Muchas cepas de *Streptococcus mutans* se aglutinan (adherencia homóloga) por la adición de dextranos de alto peso molecular. También se ha reportado que ciertas cepas de *Streptococcus mutans* forman agregados con *Nocardia*, *Neisseria* al igual que con *Cándida albicans* (adherencia heteróloga). (18)

Estos procesos son complejos e implican una variedad de componentes bacterianos y de factores externos como la dieta especialmente el consumo de sacarosa que puede influir también en la proporción de las distintas especies bacterianas que constituyen la película, la cual es fermentada por *Streptococcus mutans* y *C. albicans*, produciendo un entorno acidogénico favorable para ambos. (18)

2.2.2 Rosmarinus officinalis (Romero)

2.2.2.1 Historia

Rosmarinus officinalis ha sido utilizado desde la antigüedad como planta medicinal y para la obtención de aceites esenciales. Se dice que los faraones egipcios hacían

poner sobre sus tumbas un ramillete de romero para perfumar su viaje al país de los muertos. (11)

Su aceite esencial fue obtenido por primera vez hacia el año 1330 por Ramón Llull y desde entonces, se emplea en perfumería. En el siglo XVI la reina Isabel de Hungría lo utilizó para tratar el reumatismo que padecía convirtiéndose, “el agua de la reina de Hungría”, en uno de los remedios más famosos de la corte de Luis XIV. Los boticarios empleaban el romero en gran número de preparados pero en la actualidad sólo el aceite esencial está incluido en las farmacopeas. (11)

El nombre genérico, *Rosmarinus* proviene de la unión de dos vocablos griegos, *rhops*, arbusto y *myrinos*, aromático; que concuerdan perfectamente con las características de la planta; el nombre específico, *officinalis*, expresa su aplicación como planta medicinal. (11)

2.2.2.1 Taxonomía

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Lamiales
- **Familia:** Lamiaceae
- **Género:** *Rosmarinus*
- **Especie:** *Rosmarinus officinalis*
- **Nombre vulgar:** Romero (11)

2.2.2.2 Sinonimia

- Castellano: romero.
- Portugués y gallego: alecrim, alecrinzeiro.
- Catalán: romaní, romanyí, romanill, romer.
- Vasco: erromero, erremule.
- Francés: romarin.
- Italiano: rosmarino.
- Inglés: rosmarine.
- Alemán: rosmarin. (24)

2.2.2.3 Descripción botánica

Es un arbusto aromático de hoja perenne, perteneciente a la familia de las labiadas, que presenta un tallo leñoso y muy ramificado de entre 1 y 2 m de altura. Sus hojas, muy abundantes, largas y estrechas, crecen directamente sobre el tallo sin pedúnculo, con unas dimensiones de entre 1.5 y 3 cm de longitud por 2 ó 3 mm de anchura. Presentan un color verde oscuro por la cara y una tonalidad blanquecina por el envés. En las plantas más jóvenes se recubren de abundantes pelos que desaparecen al crecer. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos. (25)

Las flores son de color azulado, violáceo o rosa y nacen en forma de ramilletes en la unión del tallo con la hoja, con un tamaño aproximado de 5 mm. El fruto mide 1 mm y aparece dentro del cáliz en forma de cuatro pequeñas nueces de color pardo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco,

con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente. (25)

La floración se produce en primavera y otoño. El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas de color parduzco. (25)

Su reproducción se produce tanto manualmente mediante esquejes como de forma natural por semillas. (25)

2.2.2.4 Distribución geográfica y Hábitat

El género *Rosmarinus* es una planta originaria de la zona mediterránea se encuentra sobre todo en el sur de Europa, norte de África y suroeste de Asia. En la Península Ibérica es más frecuente en la mitad sur y en el este. (11)

Su hábitat son los espacios cubiertos de matorral mediterráneo, ubicándose en laderas soleadas y montañosas cerca del mar y protegido del viento. Se extiende por terrenos con sustratos calcáreos, asentándose entre pedregales o arenosos con gran permeabilidad, ya que necesita muy poca humedad para crecer. Sobrevive hasta los 1,500 m de altitud y soporta temperaturas mínimas de 10° C bajo cero. Crece de forma natural acompañado de otras plantas aromáticas como tomillos. (25)

El romero más frecuente de toda la franja mediterránea es el *Rosmarinus officinalis*, aunque existen otras variedades no tan abundantes. En el sureste peninsular se encuentra el *Rosmarinus eriocalix* que se diferencia por sus flores cubiertas de pelos y hojas más cortas, unas de color verde y otras recubiertas de una densa pilosidad

blanquecina, dando origen a la subespecie denominada *Rosmarinus tomentosus*.
(25)

2.2.2.5 Requerimientos de suelo y clima

2.2.2.5.1 Suelo

Prefiere suelos ligeros, bien drenados, medianamente secos y con limo. Los suelos húmedos inhiben su crecimiento. El pH debe ir en un rango de 6 a 7.5, con una tolerancia entre 4,5 y 8,7 (26).

2.2.2.5.2 Clima

Prefiere pleno sol, pero tolera la semi sombra. En los países mediterráneos donde se produce romero, suele crecer en seco sin riego, ya que luego de establecido las raíces profundizan mucho haciendo a la planta resistente a períodos de sequía. En los países de medio este, donde las temperaturas son altas y las lluvias mínimas al borde del mar mediterráneo, el romero deja de crecer durante los meses secos del verano. El crecimiento normalmente ocurre entre los 2 y 35 ° C, siendo su óptimo a los 18°C. En su ambiente nativo este arbusto perenne es capaz de tolerar bajas temperaturas en invierno hasta -15°C, pero se desarrolla de mejor manera en ambientes más protegidos. (26).

Generalmente se cultiva como hierba anual en climas muy fríos como aquellos encontrados en Canadá y el norte de Estados Unidos (26).

2.2.2.6 Características organolépticas de sus productos

2.2.2.6.1 Hojas deshidratadas: Deben ser de color verde a verde café, para uso culinario como especia, se prefieren aquellos productos de hojas más cortas y firmes, a fin de no perjudicar la apariencia del producto a nivel de anaquel de supermercado por ejemplo. (26)

2.2.2.6.2 Hoja fresca: Como hoja fresca se utilizan productos de distinto origen y calidad, priorizando la apariencia y aspecto fresco de una hierba recién cortada. Otros usos industriales en el área de alimentos definen sus especificaciones de producto según el contenido de esencia u otros principios activos, en desmedro de aspectos visuales. (26)

2.2.2.6.3 Esencia o Aceite Esencial: Color amarillo a amarillo - verdosa, con olor a alcanfor, incienso y miel, similar al obtenido al aplastar las hojas. (26)

La esencia de Romero, representa entre un 1,5% y 4,0% de las hojas, y está compuesta principalmente por derivados terpénicos, carburos pineno, canfeno, borneol, alcanfor. Se distinguen calidades según la composición química de la esencia, la madurez de la planta y la zona de origen del cultivar. (26)

2.2.2.7 Composición química del romero

En el caso de las hojas del romero prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7- metil-epirosmanol. (5).

La composición química del aceite esencial del romero está dada por la presencia de 20 compuestos, dentro de los cuales los componentes mayoritarios corresponden a piperitona (23,7 %), linalool (14,9 %) y α -pineno (14,9 %), este aceite se compone de 11 monoterpenos oxigenados, 6 monoterpenos no oxigenados, 2 sesquiterpenos oxigenados y 1 no oxigenado. (27)

➤ α -pineno	14,9 %
➤ Camfeno	3,33%
➤ 3-octanona	1,61%
➤ Sabineno	0,56%
➤ Mirceno	2,07%
➤ <i>o</i> -cimeno	0,71%
➤ 1,8-cineol	7,43%
➤ Linalool	14,9%

➤ Mircenol	0,75%
➤ Camfor	4,97%
➤ Borneol	3,68%
➤ Terpene-4-ol	1,70%
➤ α -terpineol	0,83%
➤ Verbinona	1,94%
➤ Piperitona	23,97%
➤ Acetato de bornilo	3,08%
➤ <i>B</i> - cariofileno	2,68%
➤ Farneseno	1,26%
➤ Germacreno	0,52%
➤ Bisabolol	1,01%

2.2.2.8 Mecanismo de acción.

La actividad antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* es mayor contra las bacterias. Se sugiere que esta capacidad se debe a la acción de flavonoides, terpenoides, polifenoles, tanino y aceites esenciales, cuyo mecanismo de acción consiste en: degradar la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que conduce a una pérdida de iones de potasio, provocando autólisis de la célula, también aumenta la

permeabilidad de la membrana, y disipa su potencial, haciendo que las bacterias pierdan su capacidad de motilidad, transporte de membrana y síntesis de ATP, haciéndolas más vulnerables al ataque inmunológico y potenciando a los antibióticos. (28)

Se ha reportado que algunos ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido rosmerico, ácido cafeico) son compuestos que inhiben el crecimiento de algunas bacterias. Algunos flavonoides tienen su participación en la inhibición debido a que estos generalmente se relacionan con la inhibición de síntesis de ADN y ARN y otras macromoléculas. (11)

2.2.2.9 Actividad antibacteriana

El extracto de hoja de *Rosmarinus officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias, la actividad citotóxica afecta directamente a la fase mitótica de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por destacar, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*, estos microorganismos son susceptibles a los componentes del extracto de romero, en cuyo extracto prevalecen el ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnosólico y flavonoides. También se obtuvieron extracto de hoja de romero y se comprobó su actividad contra bacterias Gram positivas: *S. aureus*, y *B. cereus*, y bacterias Gram negativas: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y antifúngica: *Cándida albicans*. (28)

2.2.2.10 Usos de la especie

Los usos de esta especie son variados, por las diferentes propiedades que posee. Por un lado presenta propiedades aromáticas o saborizantes, por otro presenta actividades antibacterianas y antioxidantes, estas propiedades se encuentran tanto en la planta como en sus extractos, y pueden ser utilizados para ayudar a preservar aceites y carnes (26).

En cuanto a aplicaciones terapéuticas de uso tradicional, tal como indica su nombre, el carácter de “*officinal*” corresponde al reconocimiento desde antaño por ciertas propiedades curativas. Se utiliza para controlar la anemia y para regular el flujo menstrual, fortalece la circulación (debido al alcanfor), fortifica la memoria (gracias a sus poderosos antioxidantes), es estimulante (debido al aceite esencial), espasmódico y ligeramente diurético. (26)

También se utiliza para afecciones hepáticas, anímicas, reumatismo, lumbalgias, tos y muchas otras afecciones. (26)

Una síntesis de estas aplicaciones es la siguiente:

- Hojas frescas o deshidratadas utilizadas tradicionalmente como especia. Se emplea para condimentar sopas, guisos, carnes, cecinas, pimientos, etc. También se emplea para preparar vinagres y aceites de oliva.
- Aceite esencial, extraído desde material fresco de brotes florecidos y vástagos, obteniéndose por destilación con vapor. Se utiliza en industrias de alimentos, perfumes, cosméticos y otras como detergentes industriales.

- Oleorresinas saborizantes, para lo cual se utilizan hojas deshidratadas, empleando solventes orgánicos como medio de extracción.
- Extractos antioxidantes, elaborados a partir de hojas deshidratadas, que se obtienen utilizando distintas tecnologías de extracción. Preferentemente se utiliza la extracción con CO₂ supercrítico. Este tipo de productos aprovecha la capacidad antioxidante de ciertas sustancias químicas específicas presentes en las hojas, que tienen la particularidad de no aportar caracteres de aroma o sabor cuando se les utiliza (26).

2.2.2.11 Uso del *Rosmarinus officinalis* en odontología

Nuestro país está considerado entre los doce países de mayor diversidad biológica de la tierra, sin embargo, solo le damos importancia a la medicina tradicional. (26)

El conocimiento científico de ciertas especies es desconocido. En el área dental solamente se han investigado escasas plantas; en cuanto al romero solo se utiliza de manera tradicional. Pero en otros países se han realizado muchos trabajos con el romero tanto en medicina como en odontología. Brasil es uno de los países que más ha estudiado al romero siendo utilizadas en diversa formulaciones farmacéuticas, así tenemos: los enjuagues bucales, colutorios, soluciones tópicas, pasta dental, entre otros. (28)

2.2.2.12 Efectos secundarios y contraindicaciones

Se considera que el principio activo del romero carece de toxicidad; sin embargo, las personas especialmente sensibles pueden experimentar reacciones alérgicas,

especialmente dermatitis por contacto. Asimismo, no es recomendable que las personas con cálculos biliares recurran a esta droga sin consultar previamente con un médico. Esto es debido a que cuando existe litiasis biliar, un aumento del drenaje de la vesícula biliar puede ir acompañado de una obstrucción de los conductos biliares. (29)

Finalmente, aunque la probabilidad de presentar una intoxicación por el consumo de infusiones de romero es muy baja, una sobredosis podría derivar en un cuadro caracterizado por espasmo abdominal, vómitos, gastroenteritis, hemorragia uterina e irritación renal. (29)

En cuanto al uso del aceite esencial, en concentraciones elevadas puede ser tóxico para el sistema nervioso central y provocar convulsiones. Por este motivo, no se recomienda su uso durante períodos de tiempo prolongados o a dosis mayores a las recomendadas y se debe tener especial cuidado cuando se usa en niños. Por vía tópica, la esencia de romero puede causar dermatitis y eritema en personas hipersensibles. (29)

El romero no debe usarse en el transcurso del embarazo, ya que existe la posibilidad de que induzca un aborto espontáneo por su posible efecto estrogénico. (29)

Tampoco debe emplearse durante la lactancia. (29)

2.2.3 Aceites esenciales

2.2.3.1. Definición

Son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destiladas por arrastre con vapor de agua, responsables del aroma de las plantas son mezclas complejas constituidas por diferentes tipos de compuestos orgánicos. En la naturaleza los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la defensa y protección de las plantas. Se evaporan por exposición al aire a temperatura y presión ambiente. Generalmente son insolubles en agua excepto el aceite esencial de Lavadura vera o angustifolia. Deben conservarse en un lugar fresco y en recipientes de vidrio. (30)

Los aceites esenciales tienen un gran impacto en las industrias de alimentos, cosméticas, farmacéuticas y agrícolas. Actualmente es una industria en constante desarrollo y crecimiento en diferentes países. (30)

2.2.3.2. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Propiedades Generales de los aceites esenciales.

- Líquidos a temperatura ambiente.
- Volátiles.
- Aromáticos.
- Incoloros o amarillentos.
- Menos densos que el agua (canela y clavo: más densos que el agua)
- Insolubles en agua.
- Lipófilos.

- Solubles en disolventes orgánicos.
- Solubles en alcoholes de alta graduación.
- Índice de refracción elevado.
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión.
- Poder rotatorio (quirales) (24).

2.2.3.3. Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden obtener de material vegetal por tres principales métodos:

2.2.3.3.1 Arrastre con vapor

Este proceso se lleva a cabo con un vapor seco sobrecalentado, generando usualmente por una caldera, que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. (31)

Generalmente los aceites son más livianos que el agua y muy poco solubles en ella; por ende, pueden ser separados por decantación. (31)

Este método se usa para extraer aceites de rizomas, raíces, semillas y de hojas secas o fermentadas de algunas plantas. (31)

2.2.3.3.2 Destilación con agua - vapor

En este sistema de extracción se emplea un vapor húmedo, proveniente del agua en ebullición, que traspasa el material vegetal suspendido encima y apoyado sobre una malla. La mayoría de plantas herbáceas se destilan por este método. (31)

2.2.3.3.3 Hidrodestilación

Es un proceso cuando el material vegetal se sumerge directamente al agua, que se calienta a hervor. Este método se usa para la destilación del material vegetal delicado, como por ejemplo flores. (31)

2.2.4 Clorhexidina

2.2.4.1 Generalidades

Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3,5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno, es esta naturaleza dicatiónica la que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua. (32)

La clorhexidina es sin duda el antiséptico de elección. Su utilización es amplia y es el agente más efectivo. La reducción de placa y de gingivitis alcanza el 60%. Su mecanismo de acción se realiza mediante una reducción de la formación de la

película adquirida y alteración del desarrollo bacteriano y de la inserción al diente.
(32)

Se presenta de tres formas: digluconato, acetato e hidrocloreto, la mayoría de productos usan el digluconato en concentrados del 20% o 12%. (32)

2.2.4.2 Historia

La clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra por científicos en un estudio contra la malaria. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibisguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel, posteriormente comenzó a usarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano. En odontología se utilizó inicialmente para desinfección de la boca y endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente el desarrollo de gingivitis. (32)

2.2.4.3 Mecanismo de acción:

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). En boca se adsorbe rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. (32)

2.2.4.4 Farmacodinamia

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 tiempo. Su pH óptimo se encuentra entre 5,5 y 7. En función del pH ejerce su acción frente a diferentes bacterias. (32)

Con un pH entre 5,0 y 8,0 es activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El desarrollo de resistencias es muy escaso. También reduce los microorganismos aerobios y anaerobios de la placa en un 54 - 97 % en un periodo de seis meses. En un periodo de 2 años no se desarrollan resistencias ni presencia de oportunistas o efectos adversos en la cavidad oral. (32)

Los estudios parecen indicar que la acción inhibitoria es únicamente debida a la clorhexidina unida a la superficie de los dientes. Es posible que la molécula se adhiera a la superficie por un catión, dejando los otros libres para interactuar con las bacterias que intentan colonizar la superficie del diente. Esto explicaría por qué las pastas con una base de sustancias aniónicas como el laurilsulfato sódico reducen la inhibición de la placa por la clorhexidina si se usan poco después de los colutorios. (32)

2.2.4.5 Espectro de acción.

Clorhexidina tiene un extenso 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 estafilococos. (11)

2.2.4.6 Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos de clorhexidina, indican que aproximadamente el 30% del principio activo, se retiene en la cavidad oral después del enjuague. La clorhexidina retenida se libera lentamente en los fluidos orales. Estudios realizados en animales y en humanos demuestran la escasa absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal. Los niveles plasmáticos de clorhexidina alcanzan un pico de 0,206 pg/g en humanos 30 minutos después de la ingestión de 300 mg de dicho fármaco. No se observaron niveles detectables en plasma de clorhexidina después de 12 horas de la ingesta. (32)

La excreción de clorhexidina se realiza fundamentalmente por las heces (90%); menos del 1% se excreta por la orina. (32)

2.2.4.7 Concentraciones

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0.12 % y al 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 efectivos. (11)

Las últimas investigaciones van encaminadas a conseguir una formulación de clorhexidina en medio no alcohólico igual de efectiva que la formulación de la misma en solución alcohólica. Según el estudio de se consigue con una combinación de clorhexidina al 0.12 % sin alcohol a la que se añade cetilpiridinio al 0.005 % (nueva formulación de Perio Aid), resultando igual de efectiva en el control de la formación de nueva placa que clorhexidina con alcohol al 0.12 % (Perio Aid) y que clorhexidina con alcohol al 0.2 % (Corsodyl). (11)

2.2.4.8 Indicaciones

Está indicado como agente antiplaca, para el tratamiento de gingivitis y periodontitis, en cirugía periodontal, como irrigador en alveolitis, como desinfectante en estomatitis por dentaduras (candidiasis subplaca), como tratamiento de ulceraciones aftosas y como coadyuvante en halitosis. Su uso se recomienda dos veces al día, como enjuague oral debe ser usado por lo menos 30 segundos. No se debe ingerir y debe expectorarse después de enjuagarse. (28)

2.2.4.9 Efectos secundarios

El efecto colateral más frecuente en la utilización de clorhexidina es la tinción de dientes, partes blandas de la mucosa, dorso de la lengua y restauraciones. (28)

Otro efecto secundario de los enjuagues con clorhexidina es la alteración del sentido del gusto como la hipogeusia y disgeusia, también se observa sensación de

quemazón, sequedad de tejidos blandos, y lesiones descamativas y ulcerosas de la mucosa gingival. Además un efecto colateral frecuente reflejado por los usuarios de colutorios de clorhexidina es su desagradable sabor amargo. (28)

2.2.4.10 Interacciones

Además de la potencial inactivación parcial o total de clorhexidina debido a una inadecuada formulación galénica, debemos considerar la inactivación parcial que se produce utilizando en la misma formulación asociaciones con fluoruro sódico esto ha sido contrastado por distintos estudios. (32)

Otra interacción importante es la que presenta clorhexidina con laurilsulfato sódico, empleado como excipiente en numerosos dentífricos, por lo que se recomienda el cepillado al menos 30 minutos antes de la aplicación de clorhexidina. (32)

2.3. Terminología básica

- **Abatelenguas:** Bajalenguas o depresor lingual.
- **Adhesión:** Fuerza con que se atraen las moléculas de diversos cuerpos que están en contacto.
- **Agregación:** Agrupación de partículas sólidas formando un conjunto homogéneo.
- **Bactericida:** Sustancia que destruye a las bacterias.
- **Bacteriostático:** Sustancia que impide el desarrollo de las bacterias pero que no las destruye.

- **Coagregación:** Adhesión indirecta a superficies a través de bacterias ya adheridas.
- **Hábitat:** Voz procedente de la forma verbal latina *hábitat* ('habita o vive'), introducida en español a través del inglés, que significa 'lugar de condiciones apropiadas para que viva un organismo, especie o comunidad animal o vegetal.
- **HPLC:** La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica, la fase móvil actúa de portador de la muestra.
- **Polímeros:** Sustancia química constituida por moléculas o grupos de moléculas (monómeros) que se repiten y están unidos entre sí formando cadenas.
- **Serotipo:** Categoría en la que se clasifican las bacterias o los virus según su reacción en presencia de suero que contiene anticuerpos específicos.

2.4. Hipótesis

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) tiene actividad antibacteriana frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro".

2.5. Variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (V. Independiente)	Categórica	Percepción organoléptica.	Nominal	Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> al 100%
Inhibición del crecimiento bacteriano (V. Dependiente)	Numérica continua	Dimensión del halo de inhibición. (medido en mm)	Razón	0 – 50 mm
Gluconato de clorhexidina (V. Control)	Categórica	Percepción organoléptica.	Nominal	Gluconato de clorhexidina al 0.12%
Agua destilada (V. Control)	Categórica	Percepción organoléptica.	Nominal	Agua destilada estéril
Tiempo de exposición (V. Control)	Numérica discreta	Tiempo transcurrido desde la siembra (horas)	Nominal	A las 72 y 168 horas

2.6. Definición operacional de términos

- **Aceite esencial:** Fracción líquida volátil, que contiene las sustancias responsables del aroma de las plantas.
- **Antimicrobiano:** Sustancia eficaz contra la proliferación de los microorganismos (bacterias, hongos, parásitos, virus).
- **Antiséptico:** De las sustancias antimicrobianas que se aplican a un tejido vivo o sobre la piel para reducir la posibilidad de infección, sepsis o putrefacción.
- **Colonización:** Acción de formar un ser vivo o un organismo, una colonia; en un lugar o hábitat determinado.
- **Inhibición bacteriana:** Disminución o detención del crecimiento y replica bacteriana por la acción de una sustancia o inhibidor.
- ***Rosmarinus officinalis*:** Romero.

3. CAPITULO III: DISEÑO Y MÉTODO

3.1. Tipo y nivel de investigación

El presente estudio es de tipo experimental “*in vitro*”, prospectivo, longitudinal y analítico.

El nivel de investigación de este estudio es explicativo.

3.2. Población y muestra

Se trabajó con cepas estándares de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 procedentes de American Type Culture Collection (ATCC), empleadas para evaluar el efecto inhibitor del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) al 100 %, en comparación al gluconato de clorhexidina al 0.12 % (DENTODEX®) en 30 placas Petri para que exista validez estadística.

La técnica de muestreo fue no probabilística por conveniencia.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1. Técnicas

3.3.1.1 Obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se obtuvo de la empresa Essential Oils Perú, la cual expide un certificado de pureza del aceite. (Ver Anexo 1)

El transporte y la conservación del aceite se realizaron siguiendo el protocolo expedido por la empresa Essential Oils Perú. (Ver Anexo 2)

3.3.1.2 Reactivación de la cepa bacteriana

El medio caldo Thioglicolato de sodio se utilizó para la reactivación de los *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La cepa se reactivó incubándola en el caldo Thioglicolato de sodio por 24 horas a 37°C estableciéndose su viabilidad por la turbidez del caldo, luego fue sembrada en Agar tripticasa de soya por 24 horas a 37°C para la identificación mediante las características macroscópicas y la tinción Gram que verificarán la pureza de las cepas. (Ver Anexo 3)

3.3.1.3 Preparación de los medios de cultivo

El medio de cultivo Agar Muller Hinton fue preparado según las instrucciones del fabricante repartiéndose luego el medio en las 30 placas Petri (100 mm x 15 mm) a razón de un espesor de 4 mm por placa.

Se dejaron solidificar a temperatura de medio ambiente por 15 minutos, se rotularon las placas en la parte posterior con el nombre de la sustancia a investigar (aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* al 100 %, gluconato de clorhexidina al 0.12 % (DENTODEX®) y agua destilada estéril). Se realizó el control de esterilidad incubando el material a 37°C por 24 horas. (Ver Anexo 3)

3.3.1.4 Prueba de Sensibilidad: Método de difusión en agar por pozo. (33)

3.3.1.4.1 Preparación del Inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario (0,5 en la escala de Mac Farland) como estándar de turbidez. Se tomaron 5 colonias aisladas del agar tripticasa de soya (cultivado 24 horas antes) y se procedió a ajustar el inóculo en caldo tripticasa de soya por comparación visual hasta la turbidez ($1 \times 10^6 \times 10^6$ UFC/mL) equivalente al tubo N° 0,5 en la escala de Mac Farland. (Ver Anexo 3)

3.3.1.4.2 Método de siembra

Se procedió a depositar 100 μ L de la suspensión bacteriana sobre el medio de Muller Hinton (presente en la placa Petri con 4 mm de espesor de medio) y se dispersó por técnica de hisopado en todas direcciones. (Ver Anexo 3)

3.3.1.4.3 Inoculación del principio activo

Se emplearon 80 μ L del aceite esencial de romero al 100 %, los cuales fueron depositados en pozos de 6 mm de diámetro y 4 mm de espesor, presentes en el agar Muller Hinton.

También fueron depositados 80 μ L de gluconato de clorhexidina al 0.12 % (control positivo) y agua destilada estéril (control negativo), respectivamente. (Ver Anexo 3)

3.3.1.4.4 Incubación

Las placas Petri con Agar Muller Hinton conteniendo los pozos con el aceite esencial de romero al 100 % fueron incubados a 37°C por 72 horas.

Las lecturas de los halos de inhibición se realizó utilizando un calibrador vernier o regla pie de rey a las 72 y 168.horas. (Ver Anexo 3)

3.3.2 Instrumentos

Los resultados obtenidos fueron registrados en una ficha de recolección de datos. (Anexo 4)

3.4. Procesamiento y análisis de datos

Para interpretar los datos del presente trabajo de investigación, de acuerdo a los objetivos e hipótesis; se compararon los resultados obtenidos entre los grupos que presentaron aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) y los que presentaron gluconato de clorhexidina al 0.12%: utilizando el método de análisis estadístico.

Los análisis se realizaron con el Software SPSS V. 20 (IBM SPSS Statistics 20). Se empleó un análisis descriptivo bivariado para obtener los promedios, desviaciones estándar de las variables numéricas continuas.

Se aplicó la prueba estadística T de Student para muestras pareadas, entre el grupo de estudio (aceite esencial de romero) y el grupo de control positivo (gluconato de clorhexidina). Los resultados que se obtuvieron son presentados en cuadros y gráficos de acuerdo con los objetivos señalados.

3.5. Aspectos éticos

- Certificado de pureza del aceite esencial expedida por la empresa Essencial Oils Perú. (Anexo 1)

- Certificado de conservación del aceite esencial expedida por la empresa Essencial Oils Perú. (Anexo 2)
- Normas de bioseguridad del laboratorio de microbiología de la UNMSM. (Anexo 5)

4. CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

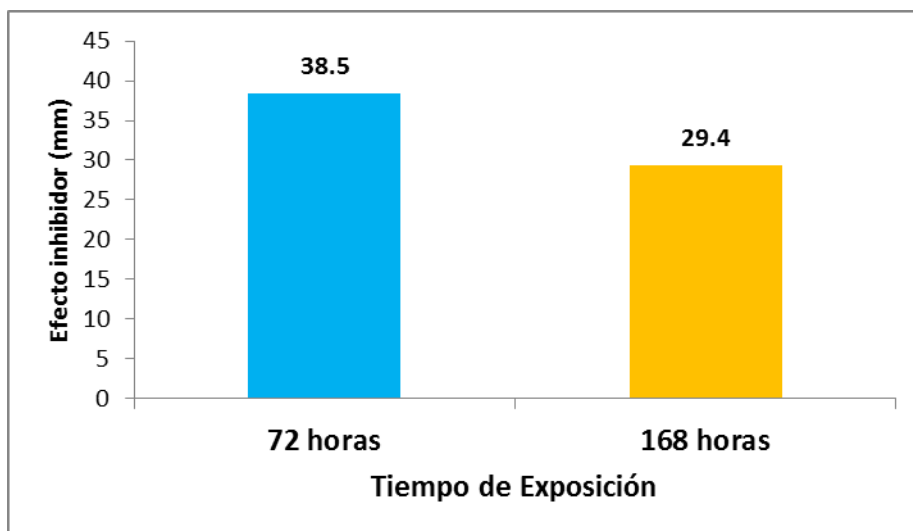
Tabla 1. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*.

Sustancias antimicrobianas	Halo de inhibición			
	Presencia		Ausencia	
	n	%	n	%
Aceite de romero al 100% (72 horas)	30	100	0	0
Aceite de romero al 100% (168 horas)	30	100	0	0
Clorhexidina al 0.12% (72 horas)	4	100	0	0
Clorhexidina al 0.12% (168 horas)	4	100	0	0
Agua destilada	0	0	4	100

Tabla 2. Diámetro de los halos de inhibición del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 y 168 horas.

Sustancia antimicrobiana	Halo de actividad antibacteriana (mm)			
	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Est
Aceite de romero al 100% (72 horas)	19.3	61.9	38.457	11.632
Aceite de romero al 100% (168 horas)	18.4	53.8	29.38	9.836
T-Student = 3.264 (P=0.002)				

Gráfico 1. Efecto inhibitor del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 y 168 horas.

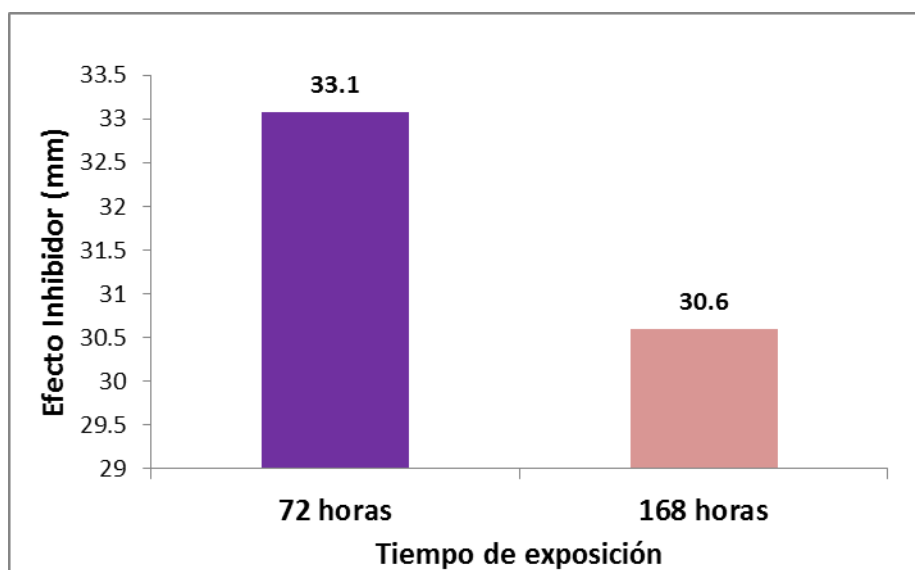


A un nivel de significancia de 5% se encontró diferencias significativas ($P=0.002$) en el diámetro de los halos de inhibición del aceite esencial de romero a las 72 horas y 168 horas, la actividad antibacteriana es mayor cuando fue expuesto a 72 las horas.

Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición de la clorhexidina al 0.12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 y 168 horas.

Sustancia antimicrobiana	Halo de actividad antibacteriana (mm)			
	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Est
Clorhexidina al 0.12% (72 horas)	31.9	34.9	33.075	1.312
Clorhexidina al 0.12% (168 horas)	28.9	33.3	30.6	2.056
U-Mann Whitney = 3 ($P=0.149$)				

Gráfico 2. Efecto inhibidor de la clorhexidina al 0.12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 y 168 horas.



A un nivel de significancia de 5% no se encontró diferencias significativas ($P=0.149$) en los diámetros de los halos de inhibición de la clorhexidina a las 72 horas y 168 horas, la actividad antibacteriana es mayor cuando fue expuesto a las 72 horas.

Tabla 4. Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 y 168 horas.

Sustancias Antimicrobianas	Halo de actividad antibacteriana (mm)		
	n	Media	Desv. Est
Aceite de romero al 100% (72 horas)	30	38.457	11.632
Clorhexidina al 0.12% (72 horas)	4	33.075	1.312
Aceite de romero al 100% (168 horas)	30	29.38	9.836
Clorhexidina al 0.12% (168 horas)	4	30.6	2.056

Wilcoxon = -1.461 ($P=0.144$)

Gráfico 3. Efecto inhibitor del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 horas.

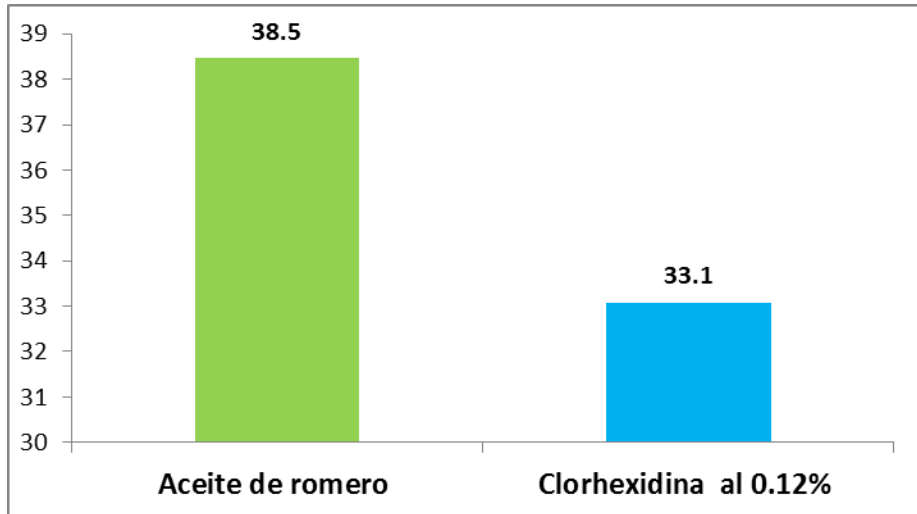


Gráfico 4. Efecto inhibitor del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 168 horas.

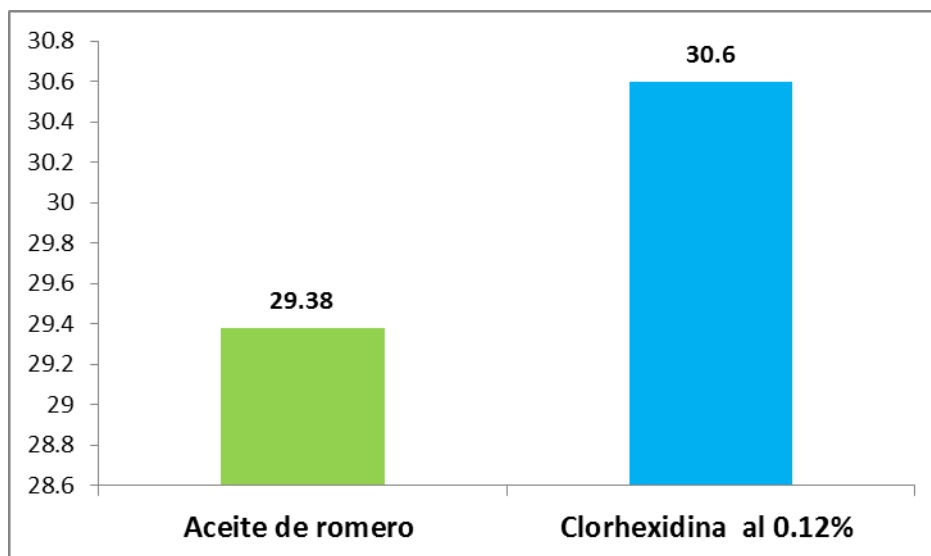
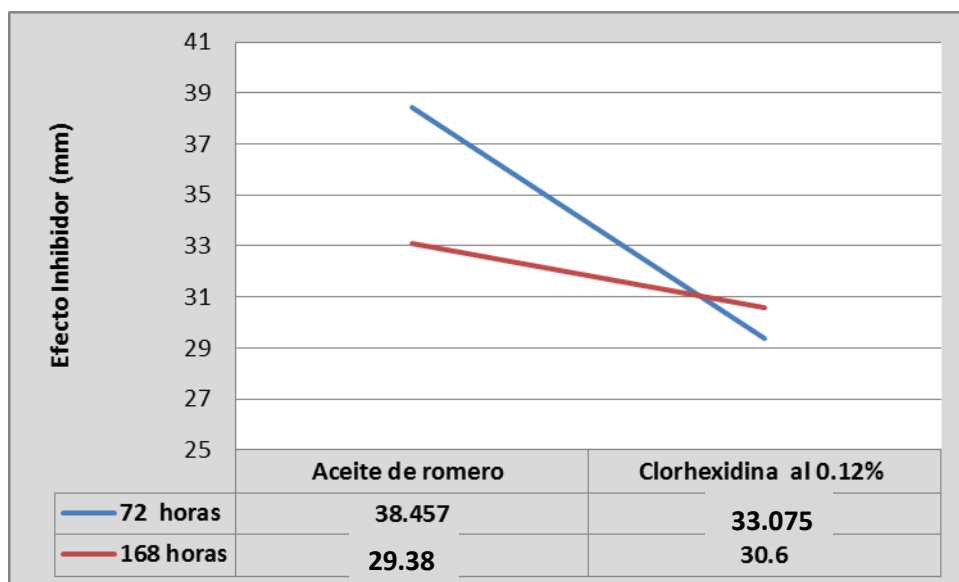


Gráfico 5. Efecto inhibitor del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y clorhexidina al 0.12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* a las 72 y 168 horas.



A un nivel de significancia de 5%, no se encontró diferencias significativas ($P=0.144$) en los diámetros de los halos de inhibición del aceite esencial de romero con la clorhexidina al 0.12% a las 72 horas y 168 horas.

4.2. Discusión

La caries dental es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, de carácter multifactorial, que causa la disolución mineral de los tejidos duros del diente por los productos finales del metabolismo ácido de las bacterias, principalmente el *Streptococcus mutans*; capaces de fermentar carbohidratos, puede afectar el esmalte, la dentina y el cemento. El *Streptococcus mutans* es sensible a la

clorhexidina, siendo empleada preventivamente, en el tratamiento de pacientes con alto número de esta bacteria en la cavidad oral, con el propósito de reducir su número y evitar la generación de caries.

En el presente estudio se determinó que el aceite esencial del romero (*Rosmarinus officinalis*) al 100% tiene actividad antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans*, mediante el ensayo microbiológico de Agar en pozo, obteniéndose a las 72 horas un halo de inhibición de 38.457 mm \pm 11.632 mm. Estudios realizados por Rocha Raquel (2016) obtuvieron un halo de inhibición de 19.70 mm \pm 0.470 mm, tras su ensayo microbiológico por el método de discos de difusión en agar, con aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) en una concentración al 100% y Solano-Solano XK, Moya-Silva TJ, Zambrano-Gutiérrez (2016) obtuvieron un halo de inhibición promedio de 11,93 mm \pm 1.38 mm, empleando el extracto oleoso de romero al 50%, aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco; siendo el resultado de ambos estudios, menores que el obtenido en nuestro estudio por medio de la técnica microbiológica de agar en pozos.

Tacca Q. Janet E. Macedo V. Sonia. Aquino A. Luz M. (2014) obtuvieron un halo de inhibición de 8.33 mm \pm 0.577 mm, tras su ensayo microbiológico con aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Streptococcus viridans*; confirmando la acción del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre cocos Gram positivos, como es el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Otros estudios realizados por Dalirsani *et al.* (2011) obtuvieron un halo de inhibición de 11.52 mm \pm 0.96 mm, tras su ensayo microbiológico con extracto alcohólico de

romero (*Rosmarinus officinalis*) y Silva M *et al.* (2008) donde el extracto hidroalcohólico de romero (*Rosmarinus officinalis*) obtuvo un halo de inhibición de 18 mm.

Rozman y Jersek (2009) ensayaron con el extracto alcohólico de romero (*Rosmarinus officinalis*), donde obtuvieron un halo de inhibición de 8.01 mm sobre cepas de *Listeria monocytogenes* ZM115; confirmando la acción del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre las bacterias Gram positivas, como es el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Con relación a la clorhexidina al 0.12%, en el presente estudio se obtuvo un halo de inhibición de 29.38 mm \pm 9.836 mm a las 72 horas. Solano-Solano XK, Moya-Silva TJ, Zambrano-Gutiérrez (2016) obtuvieron un halo de inhibición promedio de 16.13 mm \pm 1.24 mm, empleando la técnica microbiológica de difusión en disco; siendo el resultado, menor que el obtenido en nuestro estudio por medio de la técnica microbiológica de agar en pozos.

Tacca Q. Janet E. Macedo V. Sonia. Aquino A. Luz M. (2014) obtuvieron un halo de inhibición de 13.667 mm \pm 1.528 mm, tras su ensayo microbiológico con clorhexidina al 2% sobre cepas de *Streptococcus viridans*; confirmando su acción sobre cocos Gram positivos, como es el *Streptococcus mutans* ATCC 25175; sin embargo sus resultados difieren con respecto al obtenido en nuestro estudio; siendo menor frente a la técnica microbiológica agar en pozo.

Dalirsani *et al.* (2011) obtuvieron un halo de inhibición de $14.06 \text{ mm} \pm 1.70 \text{ mm}$, tras su ensayo microbiológico y Silva M *et al.* (2008) donde obtuvieron un halo de inhibición de 18 mm; siendo en ambos estudios menores al obtenido en el presente trabajo de investigación.

Este estudio permite demostrar la propiedad antibacteriana del romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al principal microorganismo causante de la caries dental, *Streptococcus mutans*. Además, tomando en cuenta el gran auge y la aceptación que existe por la medicina tradicional por parte de la población y de acuerdo con los resultados finales se puede optar por medidas de prevención que incluyan al romero (*Rosmarinus officinalis*); no sin antes realizar estudios de concentración mínima inhibitoria, biocompatibilidad, citotoxicidad y ensayos *in vivo*.

5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) al 100% presenta actividad antimicrobiana “*in vitro*” en cultivos de Agar Muller Hinton frente al crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 y 168 horas.
2. El gluconato de clorhexidina al 0.12% posee efecto inhibitor en el cultivo bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 y 168 horas.
3. El efecto inhibitor del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) al 100% es mayor que el gluconato de clorhexidina al 0.12% en el cultivo bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 horas.
4. El efecto inhibitor del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) al 100% es menor que el gluconato de clorhexidina al 0.12% en el cultivo bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 168 horas.

5.2. Recomendaciones

1. Continuar con el estudio del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) debido a su actividad antibacteriana frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con ensayos en pacientes; en estudio “*in vivo*”.
2. Se debe valorar la actividad antibacteriana del aceite esencial *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a otras bacterias Gram positivas y Gram negativas, de tal modo se cubrirá casi todo el espectro bacteriano, frente a bacterias de importancia clínica; para convertirse en una alternativa de tratamiento natural.
.
3. Realizar estudios comparativos entre las diferentes especies de *Rosmarinus*.
4. Se recomienda realizar estudios para la elaboración de colutorios y pastas dentales teniendo como principio activo el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magda Elizabeth Graciano, Yuri Alexandra Correa, Cecilia María Martínez, Andrea Burgos, Juliana Isabel Ceballos, Luisa Fernanda Sánchez. *Streptococcus mutans* y caries dental en América Latina - Revisión sistemática de la literatura. Revista Nacional de Odontología - Volumen 8, Número 14 – enero - junio 2012
2. Talavera Apaza Mirelia. Efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y perfil de compuestos fenólicos de la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) cultivada en puno. Rev. Investig. Altoandin. 2015; Vol 17 N° 2:173 – 182.
3. Mariella Huarino Acho, Donald Ramos Perfecto. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre flora salival mixta. Odontol. Sanmarquina 2012; 15(1): 27- 30.
4. Castaño H., Ciro G., Zapata J., Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias de interés alimentario. Rev. Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Colombia. 2010; 17(2):149-154.
5. Ávila R, Navarro A, Vera O, Dávila R, Melgoza N, Meza R, et al. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar. 2011; 15(43):23-36.

6. Rocha R. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [Tesis, para optar el título de Cirujano Dentista]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, 2016.
7. Solano-Solano XK, Moya-Silva TJ, Zambrano-Gutiérrez MI. Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. *Odontología* Vol.19, N° 2, Julio – Diciembre 2016.
8. Tacca Q. Janet E. Macedo V. Sonia. Aquino A. Luz M. Efecto antibacteriano in vitro del *Rosmarinus Officinalis* sobre el *Streptococcus Viridans*, *Actinomyces sp* y *Lactobacillus spp*. *Rev. estomatol. Altiplano*.2014 Jul-Dic; Vol 1 Nro 2
9. Rondón Pérez R. Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. [Tesis, para optar el título de Biólogo Microbiólogo]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, 2013.
10. Mostacero I, Bustamante O, Ruiz M. Efecto inhibitorio in vitro de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans*. *Rev. Tzhoecoen* 9: XX-XX, ISSN: 1997-3985/2013.
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, para optar el título de Cirujano Dentista].
Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013.

12. Teixeira L. Avaliação do uso do Extrato de Alecrim de Jardim (*Rosmarinus officinalis Linn*) no controle do Biofilme Dental. [Tesis, para optar el título de Cirujano Dentista]. Brasil: Universidad Federal de Paraná, 2012.

13. Dalirsani Z. In Vitro Comparison of the Antimicrobial Activity of Ten Herbal Extracts Against *Streptococcus mutans* with Chlorhexidine. Rev. Journal of Applied Sciences 11 (5): 878 - 882, 2011.

14. Minaiyan M, Ghannadi A, Afsharipour M, Mahzouni P. Effects of extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis L.* on TNBS-induced colitis in rats. Rev. Research in Pharmaceutical Sciences, April 2011; 6(1): 13-21

15. Bernardes W, Lucarini R, De Souza M, Tozatti M, Silva M, Da Silva A, Martins C, Cunha W. Ácido Carnósico: Um diterpeno isolado de *Rosmarinus officinalis* com potencial antibacteriano frente à bacterias bucais. Rev. Sociedade Brasileira de Química. 65 c, 588 – 593 (2010).

16. Rozman T, Jersek B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis L.*) against different species of Listeria. Acta Agrícola Slovenia, 2009; 93(1): 51-58.

17. Silva M., Silva M., Higino S., Pereira M., Carvalho A. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctónicas. Rev. Bras. Farmacogn. 2008 June ; 18(2): 236-240.
18. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev. CES Odont. 2013; 26(1) 44-56.
19. José Alberto Pérez Quiñones, Johany Duque de Estrada Riverón, Iliana Hidalgo Gato- Fuentes. Asociación del *Streptococcus mutans* y lactobacilos con la caries dental en niños. Facultad de Ciencias Médicas de Matanzas “Juan Guiterras Gener”. Cuba. 2007.
20. Johany Duque de Estrada Riverón, José Alberto Pérez Quiñonez, Iliana Hidalgo-Gato Fuentes. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Facultad de Ciencias Médicas de Matanzas. Cuba. 2006.
21. Daniel Pedro Núñez, Lic. Lourdes García Bacallao. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2010:9(2) 156-166
22. Luis Alejandro Aguilera Galaviz. Christie Guadalupe Sánchez Rangel. Cristanel Alejandra Neri Rosales. María Del Carmen Aceves Medina. *Streptococcus mutans* en saliva y su relación con caries dental. Rev. ADM. Vol. LXV, No. 6 Noviembre-Diciembre 2009.

23. Martínez MC, Rodríguez A. Estudio de las cepas de estreptococos del grupo mutans presentes en binomios madre – hijo. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2009; 21(2): 177-185.
24. Kuklinski C. Farmacognosia, Editorial Omega, 2003, Barcelona, España.
25. González- Michel, A. Guía técnica del cultivo de romero (*Rosmarinus officinalis*). Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México. 72 p. 2013.
26. Sánchez Fernando. Orégano y Romero: Cultivo, Calidad, Tecnología y Mejoramiento Fundación Chile. Octubre, 2005.
27. Carlos Andrés Coy Barrera. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. Rev Cub de Plantas Medicinales. 2013;18(2):237-246.
28. Purca T. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival. [Tesis, para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013.
29. Tránsito López Luengo. El romero Planta aromática con efectos antioxidantes. Ámbito Farmacéutico fitoterapia. Vol 27 Núm 7 Julio - Agosto 2008.

30. Plazas Gonzales E. Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción. Centro de Investigación y Desarrollo Científico. Bogotá 2011.
31. Stashenko Elena E. Aceites esenciales. División de Publicaciones UIS. Primera edición. Bucaramanga – Santander. Octubre 2009.
32. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. Av Periodon Implantol. 2006; 18, 1: 31-59.
33. Malpartida Quispe, Federico Martín. efecto inhibidor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio in vitro. Lima 2009. [Tesis, para optar el grado académico de maestro]. Lima: Universidad Alas Peruanas, 2009.

ANEXOS

Anexo N° 1



Essential Oils Peru SAC
Calle Los Viñedos 312 - Camacho
La Molina - Lima
Telf: (051) 736 9840
ventas@eopperu.com
www.AceitesEsenciales-eop.com

Mg. C.D. Carlos Michell Galvez Ramírez

Director de la EAP DE Odontología - Facultad de Ciencias de la
Universidad Privada Norbert Wiener

Presente.-

De nuestra consideración, reciba los saludos cordiales a nombre de
Essential Oils Perú.

Por medio de la presente tenemos a bien certificar que el producto ACEITE
ESENCIAL DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) es 100% puro, producido utilizando
el método de Destilación por Arrastre de vapor.

Este certificado es emitido a solicitud de JAVIER CUEVA ROSALES, identificado
con DNI 41842111 y código de alumno 2009100091 para su utilización en la
investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO
(*Rosmarinus officinalis*) FRENTE AL CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* ATCC
25175 IN VITRO."

Atentamente,

La Molina, 11 de Agosto del 2014



Ing. Armando Noriega Mangini
Gerente General
Essential Oils Perú

Anexo N° 2



Essential Oils Peru SAC
Calle Los Viñedos 312 - Camacho
La Molina - Lima
Telf: (051) 736 9840
ventas@eopperu.com
www.AceitesEsenciales-eop.com

Protocolo de conservación de aceites esenciales EOP

Los Aceites Esenciales (AE) EOP son 100% puros y naturales. No contienen en su constitución aditivos químicos ni conservantes. Son producidos por medio de destilación por arrastre de vapor y mantenidos en condiciones óptimas de almacenamiento pudiendo tener un tiempo de vida útil de hasta 5 años según sea el caso.

Recomendaciones de almacenamiento y conservación:

- ✓ Mantenerlos en frascos de vidrio de color oscuro, ámbar de ser posible.
- ✓ Mantenerlos con tapón y tapa para evitar la entrada constante de aire.
- ✓ Mantenerlos alejados de la luz natural y en especial de la luz ultravioleta ya que algunos compuestos son fotosensibles y pueden llegar a oxidarse.
- ✓ Se deben conservar en lugares frescos, evitando cambios bruscos de temperatura, enfriamientos y calentamientos continuos.

El tiempo de vida útil promedio es de 5 años. Sin embargo las características aromáticas se mantienen intactas por un tiempo aproximado de 1 año en la mayoría de los casos.

Observaciones:

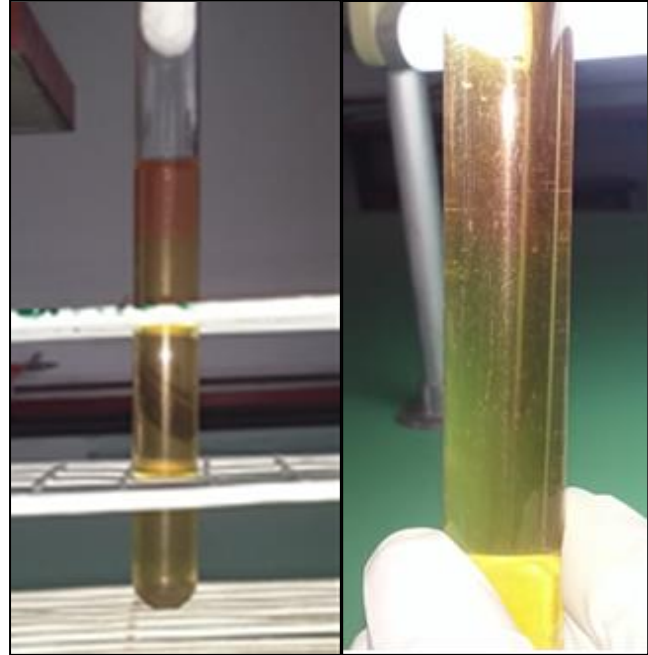
- ✓ Los AE cítricos son más propensos a la oxidación por lo que tienen un tiempo de vida menor. Para su mejor conservación se sugiere conservarlos a temperaturas entre los 4-10°C.
- ✓ Los AE de anís, hinojo y otros de la familia *apiaceae*, tienden a solidificarse a bajas temperaturas, no implicando esto su deterioro. Para ellos, es recomendable mantenerlos a temperatura ambiente.
- ✓ Los AE de vetiver y algunos maderables tienden a cambiar de aroma con el tiempo, fenómeno conocido como maduración.

Anexo N° 3

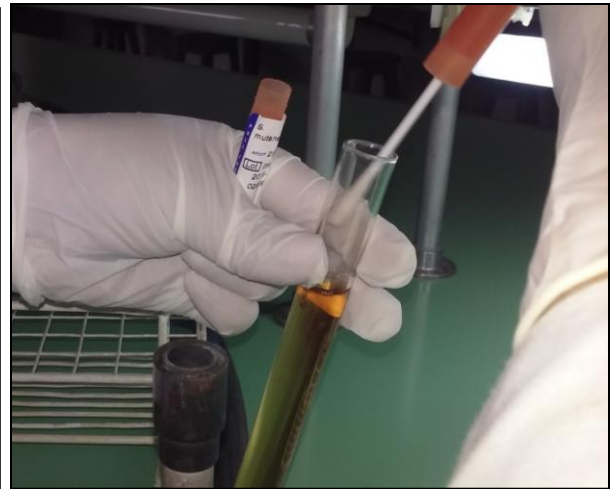
1. Reactivación de la cepa bacteriana



Streptococcus mutans
ATCC 25175

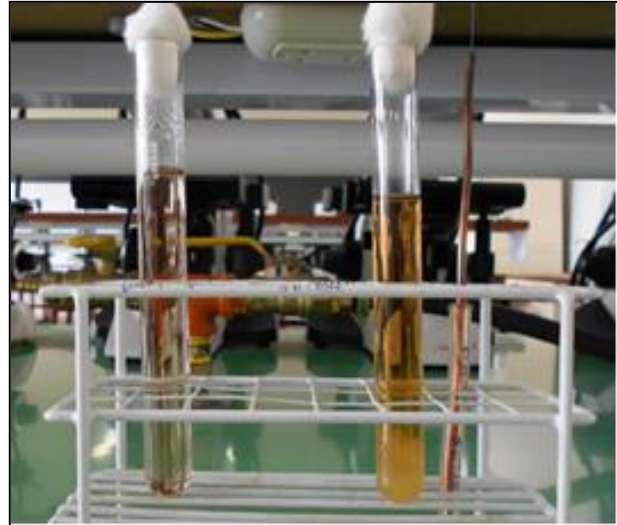


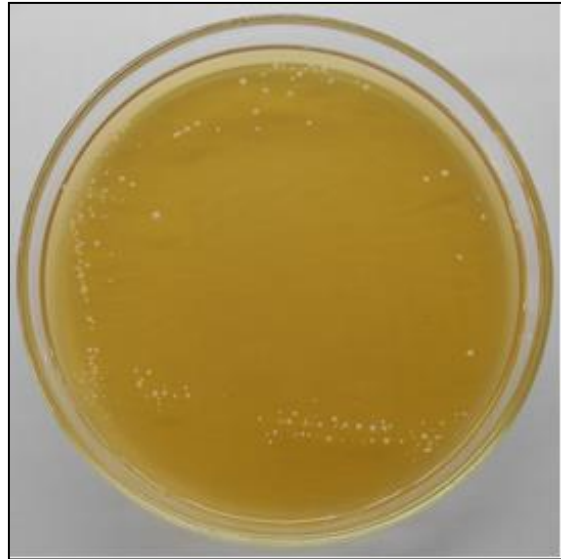
Caldo Thioglicolato
de sodio



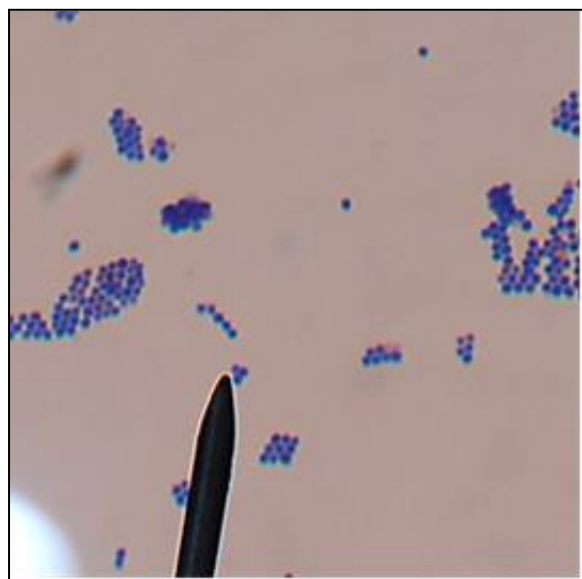


Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 reactivada en caldo
Thioglicolato de sodio





Siembra de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en Agar tripticasa de soya por 24 horas a 37°C



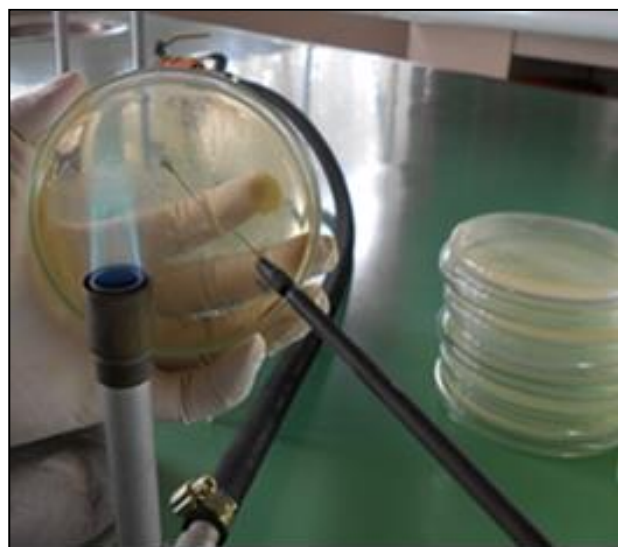
Identificación mediante las características microscópicas y tinción Gram

2. Preparación de los medios de cultivo



Preparación de los medios de cultivo y pozos en agar

3. Preparación del Inóculo





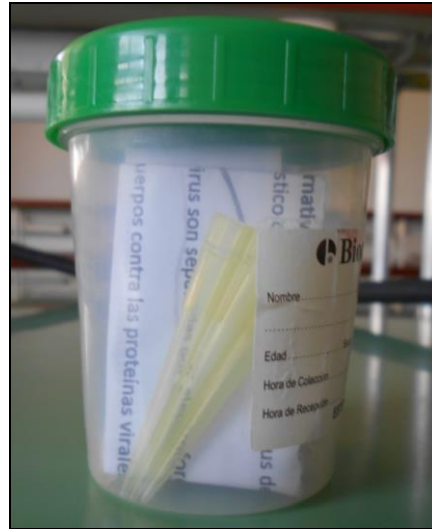
Preparación de la turbidez en
Escala de Mc Farland 0.5

4. Método de siembra



Siembra del *Streptococcus mutans* ATCC 25175
mediante técnica de hisopado

5. Inoculación del principio activo



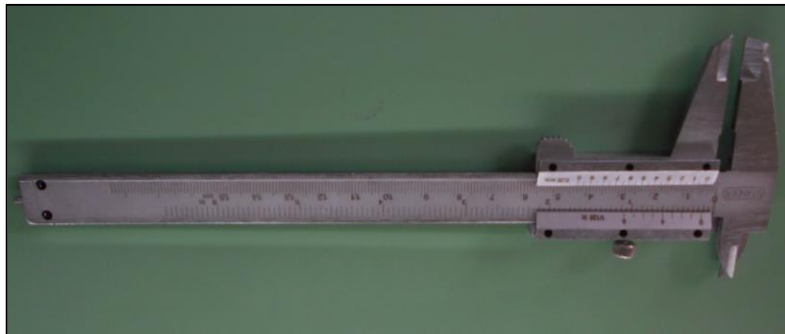
Sustancias ensayadas (clorhexidina al 0.12%, agua destilada estéril y aceite esencial de romero al 100%) e instrumentos para su inoculación





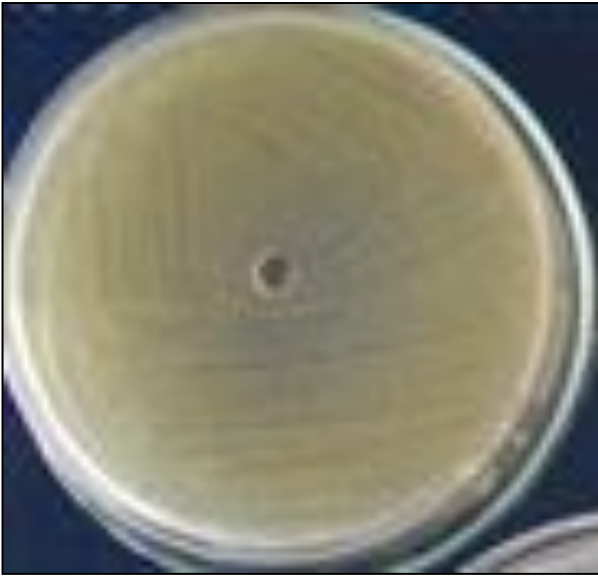
Placas Petri sembradas e inoculadas con
80 μ L de las sustancias ensayadas.

6. Lectura de placas

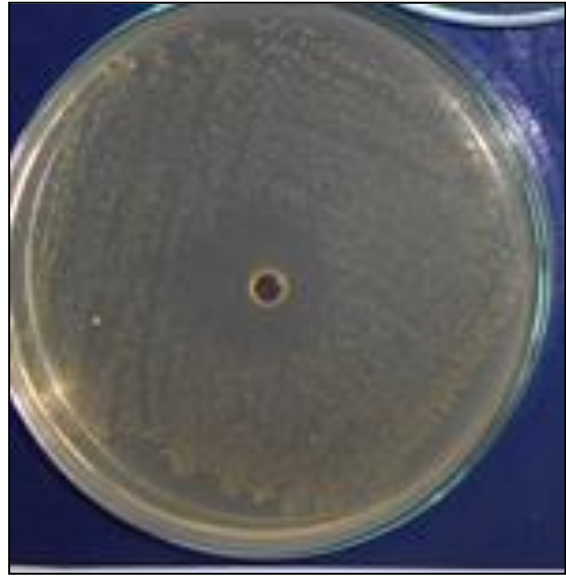


Calibrador vernier o regla

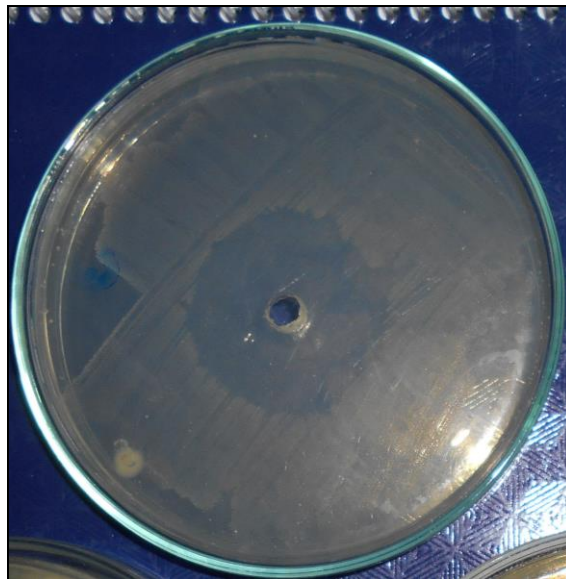
Pie de rey



Agua destilada estéril
(Control negativo)



Halo de inhibición (mm) de la
clorhexidina al 0.12% a las 72 horas.
(Control positivo)



Halo de inhibición (mm) de aceite esencial de Romero
(*Rosmarinus officinalis*) al 100% a las 72 horas.



Medición del diámetro (mm) de los halos de inhibición de las sustancias ensayadas.

ANEXO N°4

Tabla de recolección de datos para medir el tamaño de los halos de inhibición sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (mm)

Muestra	Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> "Romero"		Gluconato de clorhexidina al 0.12%		Agua destilada estéril		Muestra	Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> "Romero"		Gluconato de clorhexidina al 0.12 %		Agua destilada estéril	
	72 Horas	168 horas	72 horas	168 horas	72 horas	168 horas		72 horas	168 horas	72 horas	168 horas	72 horas	168 horas
1							16						
2							17						
3							18						
4							19						
5							20						
6							21						
7							22						
8							23						
9							24						
10							25						
11							26						
12							27						
13							28						
14							29						
15							30						

ANEXO N°5



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA
LABORATORIO DE PRÁCTICA



MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

La seguridad de cada alumno durante las clases prácticas depende de observar las siguientes MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD:

- No se podrá ingresar a los laboratorios de prácticas, sino porta mandil blanco de manga larga debidamente cerrado.
- Utilizar una **rígida técnica de asepsia** en el manipuleo de material de trabajo: (Utilizar *guantes* y *mascarillas* al momento de iniciar la práctica; *sujetarse el cabello* y utilizar *gorro* de ser necesario).
- **NO ABRIR LAS PLACAS PETRI O TUBOS DE ENSAYO CON CULTIVO BACTERIANO SIN AUTORIZACIÓN DEL DOCENTE DE PRACTICA.**
- PARA REALIZAR LA SIEMBRA O LECTURAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZAR EL MECHERO DE BUNSEN.
- Se permite colocar en las mesas de trabajo **SÓLO LAS GUÍAS DE PRÁCTICA.**
- **NO SE PERMITE DEJAR EN LAS MESAS DE PRÁCTICA: MOCHILAS, BOLSAS, ROPA Y OTROS,** utilizar los armarios o espacios asignados.
- **Esta prohibido COMER, BEBER O FUMAR** dentro de los laboratorios de prácticas.
- **LAVARSE LAS MANOS ANTES Y DESPUES DE INICIADA LA PRACTICA**
- Si sobre el mandil accidentalmente cayera cultivo bacteriano, retirárselo inmediatamente y **AVISAR AL DOCENTE** para su descontaminación.
- Si se derrama sobre la mesa de trabajo o el piso algún cultivo bacteriano, avisar al **DOCENTE** para la descontaminación respectiva.
- No dejar sobre la mesa el asa de siembra, esta debe esterilizarse antes y después de cada contacto con los microbios.
- Todo material contaminado (como pipetas, láminas, laminillas, etc.) debe eliminarse en frascos bocales con desinfectante.
- No cruzar las mangueras de los mecheros de gas y dejar las llaves de los mecheros cerradas.
- Dejar las mesas limpias y el material de laboratorio ordenado.

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES
Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente al crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> . Lima 2016.	¿Cuál es la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente al crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> . Lima 2016?	Objetivo General	El aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) tiene actividad antimicrobiana frente al crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 “ <i>in vitro</i> ”.	Variable Independiente
		•Determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>in vitro</i> .		Aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>).
		Objetivos Específicos		Variable Dependiente
		•Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) al 100 % frente al crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 “ <i>in vitro</i> ” a las 72 y 168 horas. •Determinar la actividad antibacteriana del gluconato de clorhexidina al 0.12% frente al crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en estudio “ <i>in vitro</i> ” a las 72 y 168 horas. •Comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) al 100% con gluconato de clorhexidina al 0.12 % frente al crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en estudio “ <i>in vitro</i> ” a las 72 y 168 horas.		Inhibición del crecimiento bacteriano.
				VARIABLES DE CONTROL <ul style="list-style-type: none"> • Gluconato de clorhexidina al 0.12% • Agua destilada estéril. • Tiempo en horas (72 y 168 horas)