

Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

Facultad de Odontología

EFFECTIVIDAD IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis*

ROMERO FRENTE AL *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tesis para optar el título de Cirujano Dentista

AUTOR

Janampa Quispe, Edgar

ASESOR

Mg. Pérez Suaznabar, Hugo Joel

JURADO

Dra. Paucar Rodríguez, Elizabeth

Esp. Gabrielli Alfaro, Enrique

Mg. Manrique Guzmán, Jorge Adalberto

Esp. Román Quispe, Marcial

Lima - Perú

2018

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado primero a Dios por haberme permitido lograr mis objetivos. A mi madre Maximiliana y a mi padre Teodoro, por haberme apoyado en todo momento, por sus sabios consejos, por la motivación constante que me ha permitido ser una buena persona y que sea este el motivo principal por el cual esta tesis sea realizada.

Resumen

Objetivo: Determinar la efectividad inhibitoria in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) frente al *streptococcus mutans* ATCC 25175. Materiales y métodos: Se trabajó con tres concentraciones 25mg/ml, 50mg/ml y 75mg/ml del extracto de R. officinalis y se comparó con el control positivo clorhexidina al 0.12% y un control negativo que fue agua destilada, se sembró en medio agar TSA, la efectividad inhibitoria del extracto de R. officinalis, se determinó usando el método de difusión en discos con las soluciones experimentales. Las placas sembradas e inoculadas fueron incubadas a 37°C, durante 24 y 48 horas. La lectura se realizó midiendo el diámetro, en milímetros, del halo de inhibición formado por la bacteria, usando un calibrador vernier y fueron registrados en una ficha de recolección de datos. Estos fueron analizados con la prueba de contrastes múltiples de kruskall Wallis, para grupos independientes, mientras que para la comparación entre tiempos se utilizó la prueba *Wilcoxon*, para muestras relacionadas. Resultados: nuestros hallazgos demuestran que el streptococcus mutans es susceptible a la acción del extracto de Rosmarinus officinalis. Conclusiones: El extracto etanólico de Rosmarinus officinalis mostro efectividad inhibitoria frente el S. mutans, siendo la concentración de 75mg/ml, similar a la acción de la clorhexidina.

Palabras Clave: Rosmarinus officinalis, Streptococcus mutans.

Abstract

Objective: Determine the effectiveness inhibitory in vitro of the extract ethanol of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) front to the *streptococcus mutans* ATCC 25175. Materials and methods: he work with three concentrations 25mg/ml, 50mg/ml y 75mg/ml of the extract of R. officinalis and it was compared with the positive control clorhexidine to the 0.12% and un control negative what was distilled water, it was sown in medium agar TSA, the effectiveness inhibitory of the extract of R. officinalis, it was determined using the method of difusión in discs with the experimental solutions. The sown plates and inoculated were incubated to 37°C, in anaerobic conditions during 24 y 48 hours. The Reading it was done measuring the diameter, in millimeters ,of the halo de inhibition formed by the bacterium, using a calibrator vernier and were registered in a file of data collection. The data was analized with the multiple contrast kruskall Wallis, for independent groups, while for the comparison between times the test was used *Wilcoxon*, for related samples. Results: our findings show that he streptococcus mutans is susceptible to the action of the extract of Rosmarinus officinalis. Conclusions: The extract etanol of Rosmarinus officinalis demonstrated effectiveness inhibitory front to the S. mutans, being the concentration of 75mg/ml similiary to the action of the clorhexidine.

Keywords: Rosmarinus officinalis, Streptococcus mutans.

INDICE

I. Introducción	7
II. Marco teórico	9
2.1 Bases teóricas.....	9
2.2 Antecedentes	12
2.3 Justificación.....	15
2.4 Hipótesis	16
III. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos	17
IV. Materiales y métodos	18
4.1 Tipo de estudio	18
4.2 Población/ Muestra /Criterios de selección.....	18
4.4 Método/ Técnica y procedimiento	21
4.5 Consideraciones éticas.....	22
4.6 Plan de análisis	22
V. Resultados.....	22
VI. Discusión.....	31
VII. Conclusiones	32

VIII. Recomendaciones	33
IX. Referencias bibliográficas	34
X. Anexos	38
Anexo 1: Ficha de datos ad-hoc para la investigación.....	38
Anexo 2. Informe de laboratorio.....	39
Anexo 3. Análisis de normalidad de los datos entre grupos de estudio	40
Anexo 4. Carta de presentación para el uso del laboratorio de microbiología.	41
Anexo 5. Protocolo de análisis del Extracto	42
Anexo 6. Elaboración del extracto etanólico de Rosmarinus Officinalis.....	43
Anexo 7. fotos del procedimiento.....	45
Anexo 8. Matriz de consistencia.....	50

I. Introducción

La caries dental, es una enfermedad infectocontagiosa y transmisible, que se caracteriza por la desmineralización del diente, originada por la interacción de bacterias con la dieta consumida y otros factores, es de etiología multifactorial, sin embargo, aún nos queda mucho por aprender sobre el inicio, la formación y la prevención de caries dental (Ojeda, Oviedo y Salas, 2013).

Los microorganismos que habitan en cavidad bucal son diversos, pero cabe mencionar que son los *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y los *Lactobacillus*, estas actúan tanto en el inicio y progresión de la caries dental y otras patologías a nivel bucal, dentro de ellas el *Streptococcus mutans*, es la bacteria más relevante en el proceso de la caries dental (Cruz, Diaz, Arias y Mazón, 2017).

El uso prolongado de antimicrobianos y antisépticos, han conllevado muchas veces a reacciones adversas a nivel bucal, tales como pigmentaciones de las piezas dentarias, alteraciones del gusto, entre otras, por este motivo se busca nuevas alternativas de tratamiento que no contengan efectos adversos y sean coadyuvantes junto al cepillado dental, en el tratamiento de la eliminación de la placa bacteriana (Bascones y Morante , 2006).

Dentro de la fitoterapia, aquellas plantas que tienen efectos antibacterianos podemos mencionar al romero, planta cultivada en nuestro país, rica en principios activos y con múltiple acción sobre el organismo humano, es por este motivo que, en la última década, se han ido desarrollando investigaciones acerca de las propiedades de dicha planta, con el fin de brindar aporte en información sobre la terapéutica del romero (Purca, 2013).

En el área de la odontología, el *Rosmarinus officinalis* tiene algunas aplicaciones, sobre todo en la parte preventiva, como producto de higiene, antiinflamatorios, sin embargo, a nivel de la

fitoterapia no existen muchas investigaciones en relación a la acción antibacteriana. En nuestro país, por lo que me permito formular el siguiente problema.

¿Cuál será la efectividad inhibitoria in vitro, del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* a diferentes concentraciones frente al *Streptococcus mutans* ATC25175?

II. Marco teórico

2.1 Bases teóricas

Los microorganismos que se hallan en cavidad bucal, por lo general son microorganismos de carácter complejo que aún no ha sido investigado en su totalidad y difícil de comprender en toda su magnitud. La cavidad bucal se caracteriza por contener estructuras diferentes y en ellas existen hábitats donde los microorganismos se replican. Cada parte en la boca, contiene un determinado biofilm característico, con muchas especies bacterianas diferentes, donde hay una interacción dinámica entre ellas, que hacen que la flora en cavidad bucal sea dinámica y ocasione cambios en la vida del huésped (Negroni, 1999).

La flora que habita en la saliva, son todos aquellos microorganismos que no llegaron a adherirse a la superficie dental, lengua, carrillos y membranas mucosas de la faringe, se puede mencionar que existe un grupo de bacterias entre ellas encontramos cocos Gram positivos y negativos, así como bacilos (Sosa, 2015).

La relación que existe entre streptococcus mutans y caries dental es directa, debido a que la microflora bucal contiene múltiples especies bacterianas que habitan en ella, se puede mencionar que en la patogénesis de la caries, hay una interacción bacteriana compuesta por estreptococos del grupo mutans, Lactobacillus y Actinomyces, siendo el mutans, la principal bacteria que interviene en la iniciación de esta (Ojeda *et al.*, 2013).

La adherencia inicial que se da por parte del microorganismo a la superficie dental, está dada por una proteína de la bacteria y una de la saliva, las cuales son absorbida por el diente. Para que se logre desarrollar la colonización bacteriana, es necesario que se forme una fina capa de proteínas propias de la saliva sobre la superficie dental (Nuñez y Garcia, 2010).

Las bacterias del género estreptococo, tienen la característica de ser esféricas, gram positivas las cuales forman pares o cadenas en su replicación bacteriana, estos a su vez forman múltiples nutrientes y enzimas, se caracterizan por ser una población bacteriana múltiple y su conocimiento es importante para llegar a entender su importancia clínica (Jawetz y Adelberg, 2010).

Los estreptococos se ubican en determinadas zonas de la boca. *S. sanguis* y *S. mutans*, abarcan la superficie dental, así como las superficies de las prótesis dentales. *S. salivarius*, se encuentra en la placa dura o comúnmente llamada sarro dental y es un microorganismo que interviene en boca después del nacimiento, *S. mitior*, se puede ubicar en cualquier zona de la cavidad bucal, *S. sanguis*, solo se coloniza cuando inicia la erupción dental. Entre las bacterias del género estreptococo las más importantes se puede mencionar al *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, debido a que dichas bacterias son capaces de producir ácidos en presencia de sacarosa y actúan en la aparición de la caries de esmalte (Ojeda *et al.*, 2013).

Entre los factores de virulencia que involucra al *Streptococcus mutans*, generando la producción de caries dental tenemos: Acidogenicidad, Aciduricidad, Acidofilia: Síntesis de glucanos y fructanos, Síntesis de polisacáridos intracelulares, Producción de dextranasa (Estrada, Perez y Hidalgo, 2006).

El metabolismo de la sacarosa, está dado por la ingesta de alimentos ricos en hidratos de carbono, las cuales en boca se fermentan, generándose así ácidos orgánicos, que sirven de metabolitos para aquellas bacterias que habitan en ese medio (Liébana, 2002).

El romero, planta que proviene del griego *rhops* y *myrinos*, que significa arbusto marino y esta crece en zonas rocosas y arenosas cercanas al mar, además de esto podemos cultivarlas en cualquier zona o región (Avila *et al.*, 2011).

Entre sus actividades farmacológicas, cabe mencionar que el romero posee múltiple acción sobre el organismo. A nivel gástrico actúa, estimulando la secreción de jugos gastrointestinales, relaja el músculo liso gastrointestinal, actúa eliminando los espasmos, favorece las secreciones. El *Rosmarinus* actúa también como diurético, antiinflamatorio, antiulcerogénico y antioxidante (López, 2008).

La actividad antibacteriana del romero, se conoce a través experiencia clínica, sin embargo, hay estudios hechos *in vitro*, que muestran acción frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, microorganismos que participan descomposición de los alimentos (Ardila, Vargas, Pérez y Mejía, 2009).

La clorhexidina se comercializó por primera vez en 1954, como un antiséptico cutáneo. La primera investigación que mencionó a la clorhexidina como colutorio, en la terapéutica de la gingivitis inducida por placa en humanos, la realizó Løe en 1969. En el año 1976, Løe realizó un ensayo clínico durante dos años, con un enjuague bucal a base de clorhexidina al 0,20%. Este estudio determinó que la clorhexidina al 0,20%, logro el efecto deseado y no se apreciaba reacciones adversas, se llegó a comercializar en todo Europa (Calsina y Serrano , 2005).

La clorhexidina tiene la capacidad de permanecer en boca, incluso después del enjuague lo cual conlleva a mencionar que esta, es considerada como el gold standard de los antisépticos bucales. La clorhexidina ha sido investigada tanto a corto y largo plazo, cabe mencionar que esta tiene las propiedades contra la placa dental, actúa muy bien frente a la gingivitis y no ha habido reportes que indiquen resistencia bacteriana (Francisco y Santos, 2005).

El tiempo que demora la clorhexidina en ejercer su acción, es intermedio, cuando esta formulada en base alcohólica, inicia en unos 30 seg, si es una zona que contenga vello su acción puede tardar

en iniciar en 1 hora. Las recomendaciones que se dan es esperar unos minutos para que actué el medicamento, esta permanece en boca unas seis horas a diferencias de otros antisépticos tales como la povidona yodada el cual permanece menos tiempo en comparación con la clorhexidina. La mezcla de clorhexidina y alcohol, potencia su efectividad antimicrobiana (Diomedi *et al.*, 2017).

La farmacocinética de la clorhexidina, casi un 30% del principio activo, se conserva en boca incluso después de enjuagarse, esta se libera en los fluidos de la cavidad bucal. Investigaciones hechas en animales y humanos, determinan que la absorción a nivel de la mucosa gástrica es mínima. La clorhexidina a nivel plasmático logra 0,206 pg/g en humanos, 30 minutos posterior de la ingesta de 300 mg de dicho fármaco, mas no se halla después de las 12 horas de la ingesta, algún resto en plasma de la clorhexidina. La excreción se da a través de las heces y la. Suele encontrarse dos presentaciones, al 0,12% y al 0,2%, ambas presentaciones llegan a tener el mismo efecto (Bascones y Morante, 2006).

El efecto adverso más común que reporta la clorhexidina, es la tinción marrón de los dientes, algunos materiales de restauración y de las mucosas sobre todo partes blandas de la mucosa, dorso de la lengua (Torrez, Díaz y Acosta, 2009).

2.2 Antecedentes

Sosa (2015) evaluó el efecto de antibacteriano del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y del agua ozonizada frente *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, uso dos concentraciones de diferentes compuestos (25 mg/ml y 50 mg/ml del ERO y 0,41 mg/ml y 0,82 mg/ml de agua ozonizada), las comparó con la clorhexidina al 0,12% y etanol absoluto. Sembró las bacterias con agar Mueller-Hinton, en donde se les añadió un disco de papel de filtro estéril en el centro de y se incorporó 25 µL de cada concentrado del extracto alcohólico, así también del agua ozonizada y fueron incubadas a 36°C, durante 24 h. Se halló que a la concentración de 25 mg/ml, obtuvo un

halo promedio 25 mm para *E. faecalis* y de 19 mm para *S. mutans*. En tanto a la concentración de 50 mg/ml, se halló un halo de promedio 36 mm para *E. faecalis* y de 24 mm para *S. mutans*. El halo formado por la clorhexidina al 0,12 % fue de 16 mm y es similar al obtenido por el solvente etanol absoluto, el agua ozonizada mostro halos menores al control positivo. Se concluye que a las concentraciones 25mg/ml, 50mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis*, tiene acción bactericida frente a *S. mutans* y *E. faecalis* y esta acción se da si se aumenta el agua ozonizada.

Rodriguez *et al.* (2014) realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* enfrentándolas a concentraciones de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35;40;45 y 50 mg/ml del producto vegetal, para analizar la sensibilidad in vitro de las cepas se usó el método de difusión de Kirby Bauer. Los resultados mostraron que el extracto de *Rosmarinus*, no posee acción inhibitoria frente a cepas de *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, sin embargo, actuó inhibiendo las cepas de *Streptococcus*. Por otro lado, los diámetros de halos de inhibición que presentan dichas cepas son similares entre sí a las concentraciones de 35 a 50 mg/ml. El extracto etanólico posee acción inhibitoria frente *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, no tuvo acción frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Purca (2013) realizó un trabajo cuyo objetivo fue determinar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* frente a bacterias que predominan en la flora salival y se comparó con la clorhexidina 0,12 % y el agua destilada. Selecciono 22 pacientes que se atendieron en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se tomó muestra de saliva no estimulada, se analizaron dichas muestras en el laboratorio de microbiología, posteriormente se

hizo la lectura de los diámetros de los halos de inhibición. Sus resultados mostraron acción frente a bacterias presentes en la flora mixta salival.

San Román (2013) realizó un estudio para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *R. officinalis* sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, usando como control positivo la clorhexidina al 0,12 %. Selecciono 24 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, que acudieron a atenderse a la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se tomó la muestra con conos de papel número 30, se insertó en bolsa periodontal por 30 segundos y analizadas en el laboratorio de microbiología para su procesamiento. Utilizó el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó en condiciones de anaerobiosis, por 48 h a 37 °C. Los resultados mostraron que existe igual actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* a una concentración de 75mg/ml con la clorhexidina 0,12 %, frente a cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

2.3 Justificación

2.3.1 Justificación Teórica

En la actualidad, las infecciones bacterianas son frecuentes, entre ellas la caries dental ocasionada por el *Streptococcus mutans*, la fitoterapia, realiza estudios con diferentes plantas, en nuestra investigación se realizó el estudio con el *Rosmarinus officinalis*, cuyos resultados beneficiaran directamente al profesional Odontólogo, docentes y alumnos, quienes contarán con datos reales actualizados, que servirán para ampliar el conocimiento científico, prevención de la caries dental, mejorando así, la salud pública.

2.3.2 Justificación Práctica

En la práctica actual, se usan diferentes marcas de colutorios como coadyuvantes en la higiene bucal, por lo cual es necesario conocer las ventajas y desventajas de su uso, en el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana que ejerce el *Rosmarinus Officinalis*, frente al *Streptococcus mutans*, nuestros resultados fueron positivos frente a dicha bacteria, por lo tanto podemos afirmar que el *Rosmarinus officinalis*, puede ser utilizada como tratamiento que reemplace a los colutorios, por ser de bajo costo y fácil acceso a la población y no presentar efectos adversos, en comparación con la clorhexidina en relación al costo y efectos adversos en la tinción de los dientes, mucosa sensibilidad al gusto. Por lo tanto, el objetivo de nuestro estudio es brindar una alternativa en la prevención de la caries dental, mediante la aplicación de la fitoterapia.

2.4 Hipótesis

Si el *Rosmarinus Officinalis* contiene flavonoides, terpenoides, taninos, que tienen propiedades antibacterianas, por lo tanto, es probable que tenga efectividad inhibitoria frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la efectividad inhibitoria in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero), frente al *Streptococcus Mutans* ATCC 25175.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento bacteriano mediante halos inhibitorios del extracto etanolico de *Rosmarinus officinalis* de 25mg/ml frente al *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 a las 24 h y 48h.
- Evaluar el crecimiento bacteriano mediante halos inhibitorios del extracto etanolico de *Rosmarinus officinalis* de 50mg/ml frente al *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 a las 24h y 48h.
- Evaluar el crecimiento bacteriano mediante halos inhibitorios del extracto etanolico de *Rosmarinus officinalis* de 75mg/ml frente al *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 a las 24 h y 48h.
- Comparar el crecimiento bacteriano mediante halos inhibitorios del extracto etanolico de *Rosmarinus officinalis* de 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y la clorhexidina 0.12%, frente al *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 a las 24h y 48 h.

IV. Materiales y métodos

4.1 Tipo de estudio

Experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo.

4.2 Población/ Muestra /Criterios de selección

4.2.1 Población

Cepa Streptococcus mutans ATCC 25175.

Unidad de análisis

Una placa petri inoculada con cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175.

4.2.2 Muestra

Se realizó un trabajo piloto para determinar en tamaño de la muestra y quedo conformada por 15 placas petri por grupo.

Muestreo

Asignación aleatoria de grupos.

4.2.3 Criterios de selección

Criterios de inclusión

Placas petri inoculadas con cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175, que no se contaminaron después de la siembra bacteriana.

Criterios de exclusión

Placas Petri inoculadas con cepas de Streptococcus mutans ATC25175, que hayan sufrido contaminaciones y/o alteraciones.

4.3 Variables/ Definición/ Operacionalizacion

4.3.1 Variables

Variable independiente: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero)

Variable dependiente: Efecto inhibitorio del *Rosmarinus officinalis* (romero).

Grupos de control

- Control positivo: Clorhexidina al 0.12 %.
- Control negativo: Agua destilada.

4.3.2 Definición y operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	INDICADORES	ESCALA	CATEGORIAS
	Sustancia		Porcentajes		
Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis	concentrada de hecha a base de Rosmarinus officinalis	Concentración del extracto etanolico de Rosmarinus officinalis	de disolución del Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis	Nominal	25% 50% 75%
Efecto inhibitorio	Es la ausencia del crecimiento bacteriano ocasionada por el Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis	Crecimiento bacteriano	Diámetro del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con el Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis	Razón	0-X mm

4.4 Método/ Técnica y procedimiento

4.4.1 Método

Observación directa del halo inhibitorio.

4.4.2 Técnica

Se realizó una observación directa, y medición del halo inhibitorio de las diferentes concentraciones de *Rosmarinus officinalis* frente a *Streptococcus mutans* ATC25175, los datos obtenidos, fueron registrados en una ficha de recolección de datos (ver Anexo 01).

4.4.3 Procedimiento

Se recolecto 2 kg de dicha planta, la cual fue llevada al Instituto de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, donde se procesó el extracto etanólico, obteniéndose tres concentraciones 25, 50 y 75 mg/ml, las cuales fueron guardadas en frascos color ámbar estériles y conservadas en refrigeración.

Para la presente investigación se utilizaron material biológico: cepa de *Streptococcus mutans* aisladas ATC25175, Así mismo se utilizó material y equipos de laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología UNFV.

Se realizó la siembra en el medio de cultivo Agar Müller-Hinton, en la placa Petri, se procedió a la elaboración de cuatro pocillos, 03 para las concentraciones del extracto y una para la clorhexidina al 0.12 % que es el control positivo.

Se marcó en la base de la placa, con la finalidad de diferenciar el tipo de solución y posición de cada pocillo, posteriormente se rotulo cada placa petri utilizada, luego se colocó en cada pocillo 50 ul, de cada solución experimental, sobre la superficie del medio la cual se dejó reposar por 30 minutos antes de incubarlo.

Luego se colocó las placas petri dentro de la incubadora a 37 °C por 24 y 48 horas, para después proceder con la lectura de las medidas de los halos de inhibición, con la ayuda del pie de rey o calibrador.

4.5 Consideraciones éticas

El autor no presenta conflicto de interés con las marcas utilizadas en este estudio, se respetará los códigos de ética de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Esto será indicado en una declaración jurada mencionando que el presente trabajo no se encuentra bajo la influencia de las marcas de los productos utilizados.

4.6 Plan de análisis

Los datos obtenidos fueron procesados en una laptop (HP CORE i5 Windows 10), mediante el programa estadístico Spss 24.0 versión en español y la base de datos Excel. Los resultados que se obtuvieron serán presentados en cuadros y gráficos de acuerdo con los objetivos señalados.

V. Resultados

Tabla 1

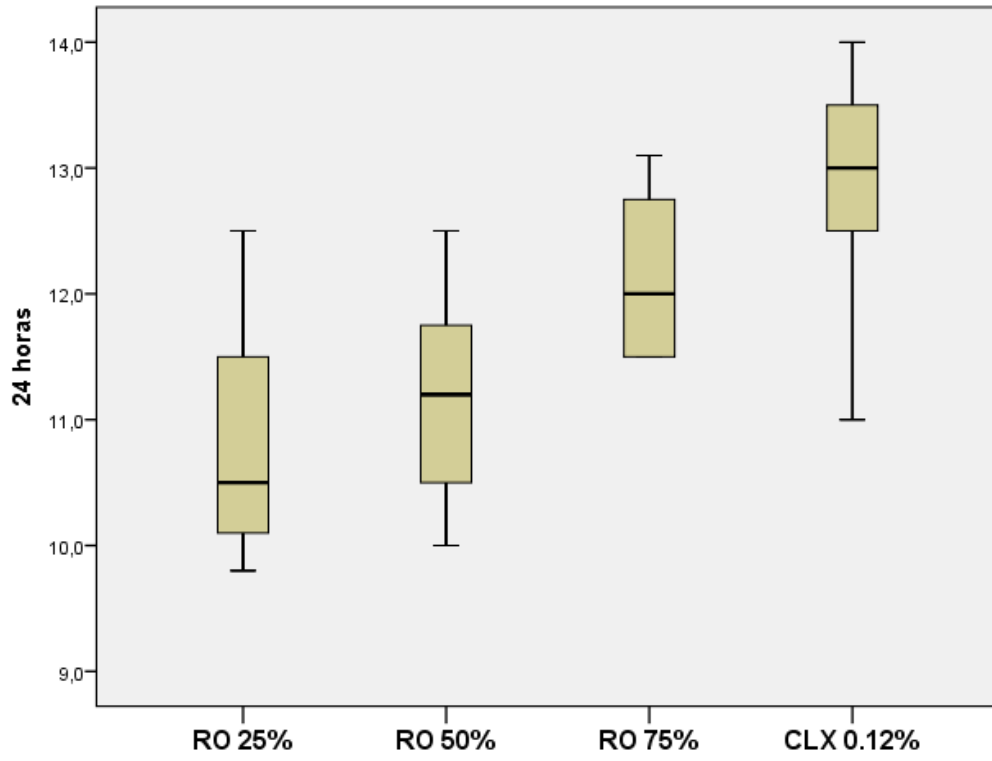
Valores descriptivos de los halos de Inhibición de EERO frente al streptococcus mutans ATC25175 a las 24 horas.

Grupos	Media	IC 95%		Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior				
RO 25%	10,833	10,349	11,317	10,5	,8740	9,8	12,5
RO 50%	11,213	10,750	11,677	11,2	,8365	10,0	12,5
RO 75%	12,193	11,840	12,546	12,0	,6375	11,5	13,1
CLX	12,893	12,427	13,359	13,0	,8413	11,0	14,0

RO=Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%;

IC: Intervalo de confianza para la media.

La tabla 1, muestra los valores descriptivos para diámetro del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 24 horas. Para el grupo RO 25%, se observó un halo de inhibición (10.833mm±0.874mm) con una mediana de 10.5 mm, levemente menor que lo observado en el grupo RO 50% donde el halo de inhibición fue 11.213mm±0.8365mm) con una mediana de 11.2 mm, el grupo RO 75% presento valores del halo de inhibición de 12.193mm±0.6375 con mediana de 12mm y el grupo CLX 0.12% que presento los valores más altos con 12.893mm±0.8413mm y mediana de 13 mm. Se observada una diferencia marcada entre los grupos, los que parecen ir en aumento, siendo el grupo de RO 75%, el que presenta valores más altos en comparación a la clorhexidina.

*Figura I.*

Distribución de los valores del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 24 horas.

Tabla 2

Valores descriptivos de los halos de inhibición de *EERO* frente al *streptococcus mutans ATC25175* a las 48 horas.

Grupos	Media	IC 95%		Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior				
RO 25%	10,953	10,498	11,408	10,5	,8219	10,0	12,5
RO 50%	11,393	10,916	11,870	11,5	,8614	10,0	13,0
RO 75%	12,253	11,937	12,570	12,0	,5718	11,5	13,0
CLX	13,000	12,568	13,432	13,0	,7792	11,5	14,0

RO=Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%;

IC: Intervalo de confianza para la media.

La tabla 2, muestra que, a las 48 horas de evaluación los valores descriptivos para diámetro del halo inhibitorio, para los grupos evaluados muestra para el grupo RO 25% se observó un halo de inhibición de 10.953mm±0.8219mm con una mediana de 10.5 mm, menor que lo observado en el grupo RO 50% donde el halo de inhibición fue 11.393mm±0.8614mm) con una mediana de 11.5 mm, el grupo RO 75% presento valores del halo de inhibición de 12.253mm±0.5718 con mediana de 12mm y el grupo CLX 0.12% que presento los valores más altos con 13mm±0.7792mm y mediana de 13 mm. Se observada diferencia marcada entre los grupos, los que parecen ir en aumento siendo el grupo de RO 75%, el que presenta valores más altos en comparación a la clorhexidina. Además, se aprecia cierta asimetría en la distribución especialmente en los grupos de RO al 25% y 75%.

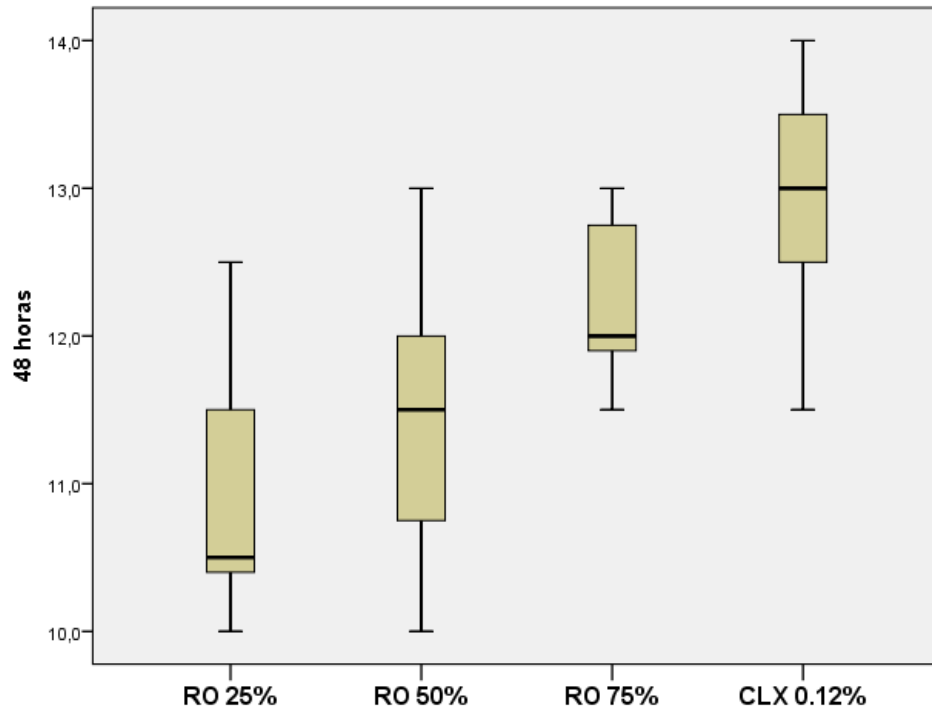


Figura II. Distribución de los valores del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 48 horas.

Tabla 3

Comparación de medias de los halos de inhibición de EERO frente al streptococcus mutans ATC25175 entre grupos de estudio a las 24 horas.

	RO 25%	RO 50%	RO 75%	CLX
RO 25%	---	p=1.000	p=0.007*	p=0.000*
RO 50%	---	---	p=0.076	p=0.000*
RO 75%	---	---	---	p=0.590
CLX	---	---	---	---

*Basado en la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para muestras independientes; *Diferencias de medias estadísticamente significativas ($p < 0.001$);*

RO=Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%

La tabla 3, describe que, al realizar las comparaciones entre pares de grupos, se observa que las diferencias halladas son estadísticamente significativas entre los grupos RO 25% vs RO 75% ($p=0.007$); RO 25% vs CLX ($p < 0.001$) y entre los grupos de RO 50% vs CLX ($p < 0.001$). Se observa que, a las 24 horas los grupos del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (RO) al 25 y 50% presentan los valores mas bajos de halo inhibitorio, mientras la clorhexidina los mas altos, no presentando diferencia significativa al compararla con el grupo RO al 75%.

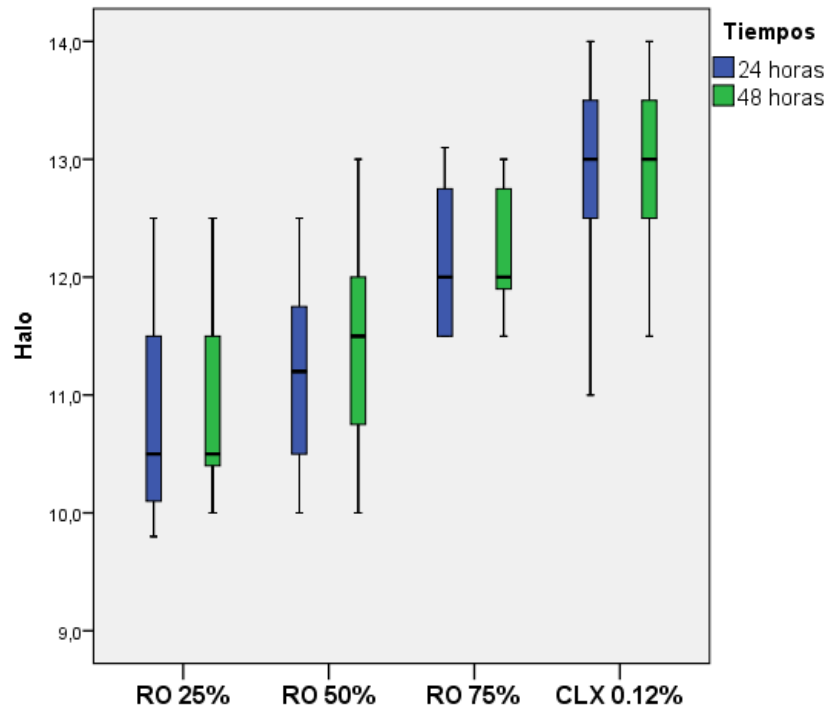


Figura III. Distribución de los valores del halo de inhibición entre las 24 y 48 horas dentro de cada grupo de estudio.

Tabla 4

Comparación de medias de los halos de inhibición de EERO frente al streptococcus mutans ATC25175 entre grupos de estudio a las 48 horas.

	RO 25%	RO 50%	RO 75%	CLX
RO 25%	---	p=1.000	p=0.006*	p=0.000*
RO 50%	---	---	p=0.143	p=0.000*
RO 75%	---	---	---	p=0.444
CLX	---	---	---	---

*Basado en la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para muestras independientes; *Diferencias de medias estadísticamente significativas ($p < 0.001$);*

RO=Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%

La tabla 4, describe las comparaciones entre pares de grupos, muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RO 25% vs RO 75% ($p=0.006$); RO 25% vs CLX ($p < 0.001$) y entre los grupos de RO 50% vs CLX ($p < 0.001$).

Se observa que, a las 48 horas, los grupos del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (RO) al 25 y 50% presentan los valores mas bajos de halo inhibitorio, mientras la clorhexidina presenta valores mayores de halos inhibitorios.

No se ha presentado diferencia significativa al compararla con el grupo RO al 75%.

Tabla 5

Comparación de medias del halo de inhibición entre tiempos dentro de cada grupo de estudio.

Grupos	Tiempos	Media	Mediana	Desviación estándar	p-valor ^a
RO 25%	24 horas	10,83	10,50	0,87	0.071
	48 horas	10,95	10,50	0,82	
RO 50%	24 horas	11,21	11,20	0,84	0.027*
	48 horas	11,39	11,50	0,86	
RO 75%	24 horas	12,19	12,00	0,64	0.276
	48 horas	12,25	12,00	0,57	
CLX	24 horas	12,89	13,00	0,84	0.063
	48 horas	13,00	13,00	0,78	

**Diferencias significativas ($p < 0.05$); Basado en la prueba Rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas.*

La tabla 5, nos muestra el aumento observado en todos los grupos entre las 24 y 48 horas es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) solo para el grupo de RO al 50%. Los demás grupos no presentan cambios entre las 24 y 48 horas. La distribución de los valores del diámetro del halo inhibitorio muestra una marcada diferencia entre grupos mas no dentro de cada uno de ellos.

VI. Discusión

En la actualidad, las plantas medicinales han ido asumiendo un rol importante como alternativa en tratamientos odontológicos, debido a sus propiedades antibacterianas frente a microorganismos que ocasionan patologías a nivel bucal.

En investigaciones hechas con plantas medicinales, para comprobar su actividad antibacteriana, se ha empleado métodos de difusión en agar con discos, estas consisten en colocar un pocillo de 5mm embebidos con solución experimental en el agar, y se incuba a 24hr, 48hr, de acuerdo al estudio que se realice, en caso se observe actividad bacteriana se conformara halos de inhibición que serán registrados por el investigador.

Nuestros resultados demuestran que el *Streptococcus mutans* es susceptible a la acción del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*, evidenciándose con la presencia de halos de inhibición alrededor del disco embebido con solución experimental.

Al contrastar, los resultados reportados en su investigación por parte de Sosa (2015) y Purca (2013) con la presente investigación, se halló que existe diferencias significativas con cada uno de ellos, en cuanto a los promedios de los diámetros de halos de inhibición frente al *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones, dicha diferencia es marcada, posiblemente se deba al tipo de solución empleada por cada uno de ellos, y también a la bacteria que fue analizada por parte de los investigadores mencionados.

Asimismo, nuestros resultados encontrados concuerdan con los hallados por San Román (2013) ya que al comparar ambos resultados no se observa diferencias significativas en cuanto a los promedios de los diámetros de halos de inhibición frente al *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones, similares a nuestra investigación.

VII. Conclusiones

- El extracto etanólico de *Rosmarinus. Officinalis*, presentó actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATC25175, se muestran diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición entre los grupos EERO 25% vs EERO 75%; EERO 25% vs Clorhexidina y entre los grupos de EERO 50% vs Clorhexidina.
- Al incrementar la concentración del extracto, se observa un aumento en mm del halo de inhibición, sin embargo, no se llega a superar la acción dada por clorhexidina al 0,12 %.
- La actividad inhibitoria del extracto etanólico de *R. officinalis* a 75 mg/ml es similar al efecto ejercido por la clorhexidina al 0,12 %. Cabe resaltar que dicha concentración tuvo el mayor efecto antibacteriano.

VIII. Recomendaciones

- Desarrollar nuevas investigaciones acerca del *Rosmarinus officinalis*, sobre cepas bacterianas que interactúan a nivel de cavidad bucal, las cuales producen patologías.
- Elaborar estudios que determinen Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*.
- Crear estudios in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*, en diferentes concentraciones que difieran del estudio realizado, con la finalidad de comparar los resultados.
- Generar pruebas en pastas y colutorios dentales, que contenga en sus compuestos el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

IX. Referencias bibliográficas

- Ardila, Q., Vargas, A., Pérez, C. y Mejía, G. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de Extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 8, 47-57.
- Avila, S., Navarro, C., Vera, L., Davila, M., Melgoza, P. y Meza, P. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 15(43), 23-36.
- Bascones, A. y Morante, S. (2006). Antisépticos orales. Revisión de literatura y perspectiva actual. *Avances en Periodoncia*, 18(1), 31-59. Recuperado de <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v18n1/original3.pdf>
- Calsina, G. y Serrano, G. (2005). ¿Existen realmente diferencias clínicas entre las distintas concentraciones de clorhexidina? comparación de colutorios. *RCOE*, 10(4), 457-464. Recuperado de <http://scielo.isciii.es/pdf/rcoe/v10n4/puesta5.pdf>
- Cruz, Q., Diaz, S., Arias, S. y Mazón, B. (2017). Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), 87-88. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v54n1/est08117.pdf>
- Diomedi, A., Chacon, E., Delpiano, L., Herve, B., Jemenao, I., Medel, M., . . . Sifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. *Revista Chilena de Infectología*, 34(2), 156-174. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v34n2/art10.pdf>
- Estrada, R., Perez, Q. y Hidalgo, G. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar, *Revista Cubana de Estomatología*, 43(1), 4. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-75072006000100007

- Francisco, J. y Santos, A. (2005). Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en evidencia científica. *RCOE*, 10(4), 445-452. Recuperado de <http://scielo.isciii.es/pdf/rcoe/v10n4/puesta4.pdf>
- Jawetz, M. y Adelberg. (2010). *Microbiología Médica*. Mexico D.F: Mc Graw Hill.
- Liebana, U. (2002). *Microbiología Oral*. España: Mc Graw-Hill. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/149801897/Liebana-Urena-Microbiologia-Oral>
- Lopez, L. (2008). El Romero planta aromática con efectos antioxidantes. *OFFARM*, 27(7), 61-62. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/357638766/El-romero-Planta-aromatica-con-efectos-antioxidantes>
- Negróni, M. (1999). *Microbiología Estomatológica*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Núñez, P. y García, B. (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2), 159. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n2/rhcm04210.pdf>
- Ojeda, G., Oviedo, G. y Salas, A. (2013). Streptococcus mutans y caries dental. *Revista CES Odontología*, 26(1), 46. doi:<http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
- Purca , P. (2013). *Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre flora salival*. tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3092/1/Purca_pt.pdf
- Rodríguez, F., Espinoza, P. y Vergara, E. (2014). Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de Rosmarinus Offcinalis “Romero” sobre el crecimiento Streptococcus pyogenes,

Staphylococcus aureus y *Pseudomonas aeruginosa*. *Salud & Vida Sipanens*, 1(2), 63-74.

Recuperado de <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/65/64>

San Roman, I. (2013). *Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodonta*. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima .

Sosa, J. (2015). *Efecto antibacteriano In Vitro del extracto alcoholico de Rosmarinus Officinalis (Romero) y del agua ozonizada sobre Streptococcus mutans Y Enterococcus faecalis*. tesis de pregrado, Universidad Señor de Sipan, Pimentel.

Torrez, L., Díaz, A. y Acosta, M. (2009). La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. *Gaceta Medica Espirituana*, 11(1), 2-3.

ANEXOS

X. Anexos

Anexo 1: Ficha de datos ad-hoc para la investigación

N° PLACA	MEDIDA DE HALO DE INHIBICION EN LA PLACA TSA				
	Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (ROMERO)			Control positivo clorhexidina al 0.12%	Control negativo agua destilada
	25%	50%	75%		
Cultivo N°1					
Cultivo N°2					
Cultivo N°3					
Cultivo N°4					
Cultivo N°5					
Cultivo N°6					
Cultivo N°7					
Cultivo N°8					
Cultivo N°9					
Cultivo N°10					
Cultivo N°11					
Cultivo N°12					
Cultivo N°13					
Cultivo N°14					
Cultivo N°15					


Anexo 2. Informe de laboratorio

Presente:

Me permito dirigirme en respuesta al oficio N° 019 -2018-TT-GYT-FO-UNFV de fecha 6 de febrero del 2018, por el cual se me designó supervisor para el uso del laboratorio de microbiología, para el desarrollo de la tesis del bachiller Janampa Quispe Edgar, que después de haber ejecutado el trabajo titulado:

°EFECTIVIDAD IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rosmarinus officinalis*
ROMERO FRENTE AL *Streptococcus mutans* ATCC 25175°.

Doy constancia de que el trabajo se ejecutó en el laboratorio de microbiología y fue finalizado óptimas condiciones bajo mi supervisión.



C.D. Sierra Garmendia, Roberto

Anexo 3. Análisis de normalidad de los datos entre grupos de estudio

Tiempo	Grupos	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	p-valor
24 horas	RO 25%	,883	15	,053
	RO 50%	,937	15	,351
	RO 75%	,846	15	,015*
	CLX	,917	15	,175
48 horas	RO 25%	,900	15	,096
	RO 50%	,963	15	,743
	RO 75%	,875	15	,040*
	CLX	,892	15	,071

*No presenta distribución normal ($p < 0.05$)

Anexo 4. Carta de presentación para el uso del laboratorio de microbiología.



Universidad Nacional
Federico Villarreal
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL”

CARGO

OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

TALLER DE TESIS 1 - 2017

Oficio N°018-2018-TT-GYT-FO-UNFV

Pueblo Libre 6 de febrero 2018

Mg. C.D.
ELOY MENDOZA GARCÍA
Jefe del Departamento Académico de la
Facultad de Odontología - UNFV
Presente. -

Asunto: Autorización a la Bachiller para
realizar su trabajo de Investigación.

De mi consideración:

Me dirijo a usted para saludarle muy cordialmente, y asimismo presentarle al Bachiller EDGAR JANAMPA QUISPE, quien se encuentra elaborando su Tesis titulada “EFECTIVIDAD IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE ROSMARINUS OFFICINALIS ROMERO FRENTE AL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175” el cual solicita la autorización para el uso del Laboratorio de Microbiología el cual está a cargo del C.D. Luis Gonzales, dicho trabajo estará supervisado por el C.D. Roberto Sierra Garmendia, el uso del Laboratorio es indispensable para que pueda desarrollar su protocolo de Tesis basado en el tema que anteriormente se describe.

Con la seguridad de contar con su apoyo, que redundara en beneficio de los jóvenes estudiantes, me suscribo a usted.

Atentamente,



MG. CD. CARMEN ROSA HUAMANI PARRA
Jefa (a) de Grados y Títulos
Facultad de Odontología
U.N.F.V.

CRHP/Patty M.

Anexo 5. Protocolo de análisis del Extracto



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00121-CPF-2018

ORDEN DE ANÁLISIS	: 004803/2018
SOLICITADO POR	: EDGAR JANAMPA QUISPE
MUESTRA	: EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> (ROMERO)
NÚMERO DE LOTE	: ---
CANTIDAD	: 01 Kg. Aprox.
FECHA DE RECEPCIÓN	: 09 de Marzo del 2018
FECHA DE FABRICACIÓN	: ---
FECHA DE VENCIMIENTO	: ---

Se realiza la extracción alcohólica del romero (*Rosmarinus officinalis*) y se obtuvo concentraciones de 25%, 50% y 75%

Lima, 26 de Marzo del 2018

QF. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

c. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
✉ mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification

N° BR233265



Anexo 6. Elaboración del extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis*

Obtención de las hojas de *Rosmarinus officinalis*



Obtención del extracto etanolico de *Rosmarinus officinalis*

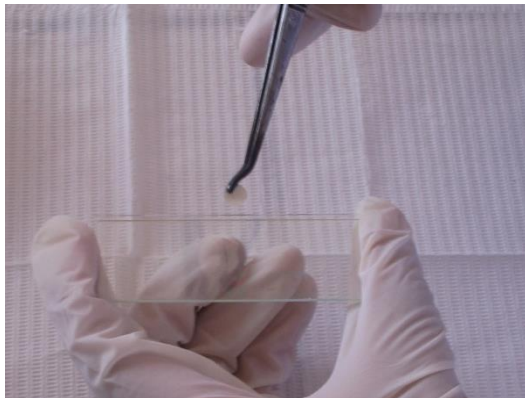




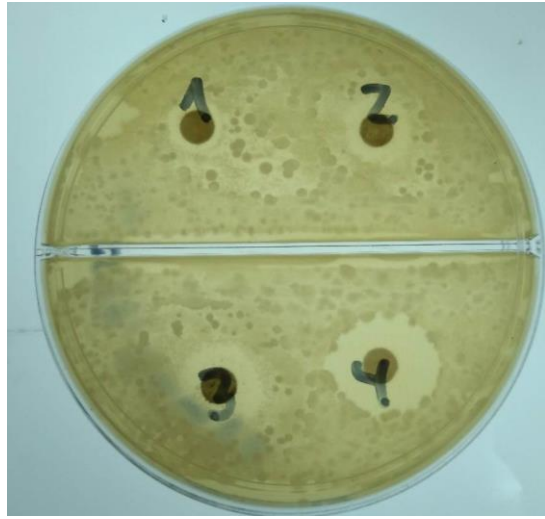
Anexo 7. fotos del procedimiento

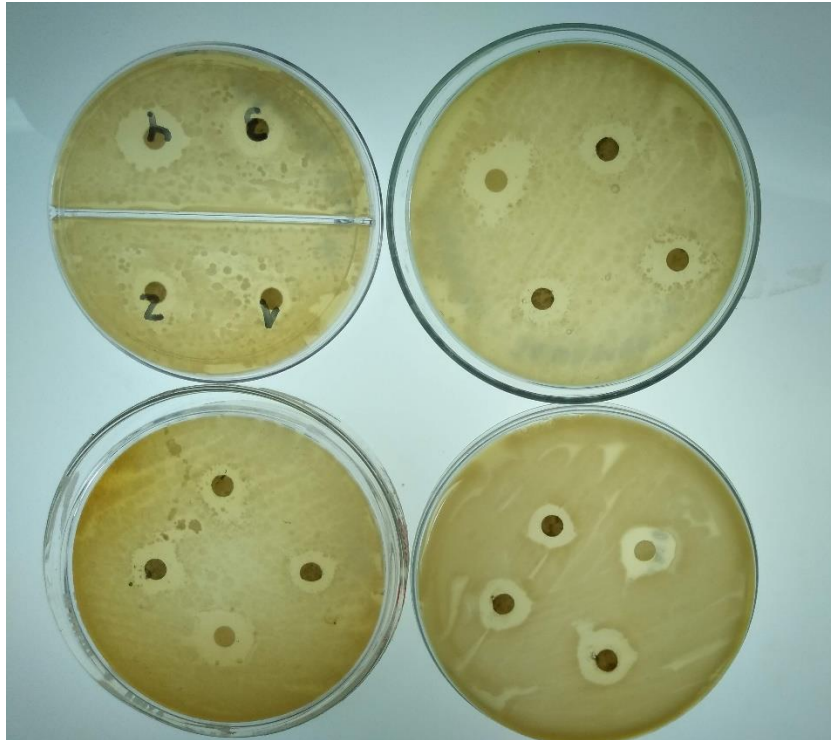


- Método de difusión en discos

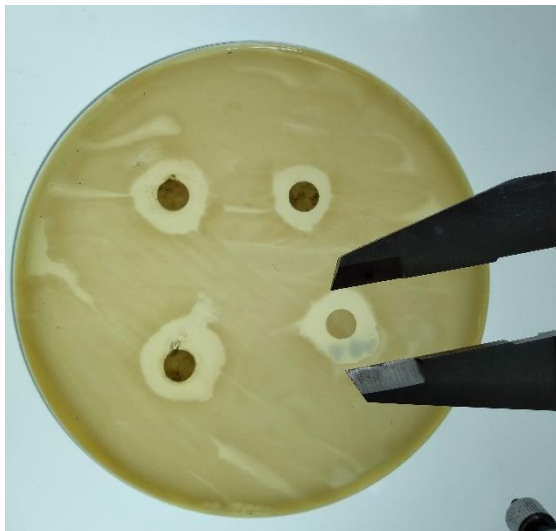


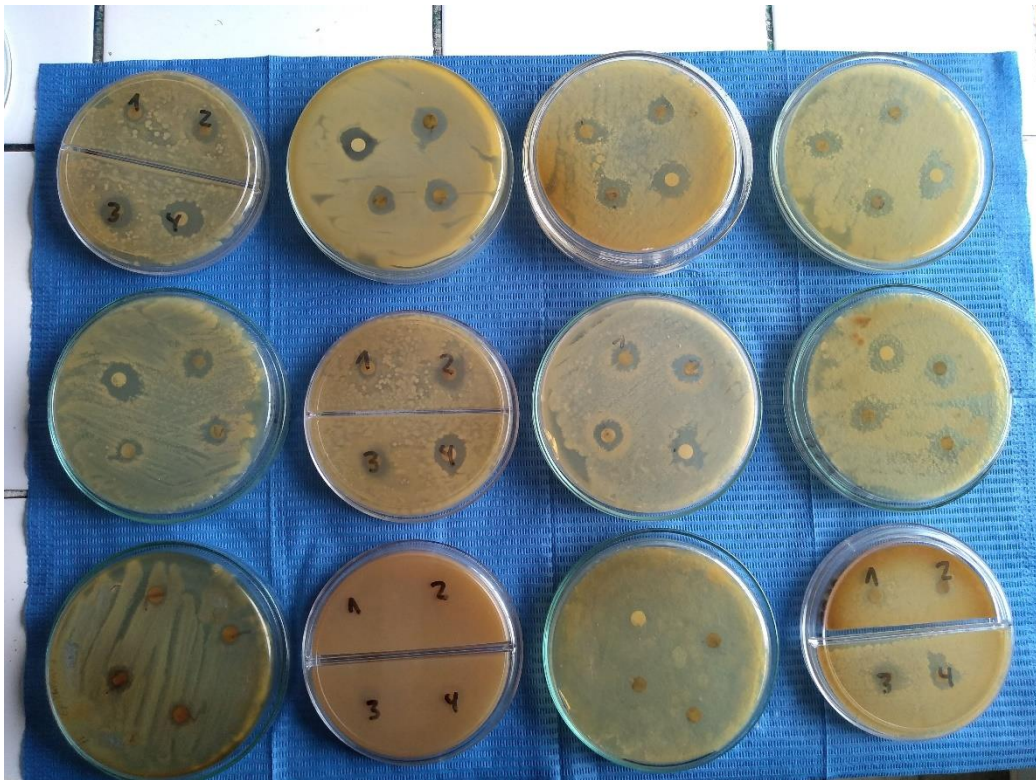
- placas petri post incubación





- Medición de los halos de inhibición.





Anexo 8. Matriz de consistencia

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variables	Metodología
¿Cuál es la efectividad inhibitoria “in vitro” del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis a diferentes concentraciones frente al Streptococcus mutans?	<p>General: Determinar la efectividad inhibitoria “in vitro” de diferentes concentraciones del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero), frente al Streptococcus Mutans ATCC 25175.</p> <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la efectividad inhibitoria del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) a la concentración de 25 % frente al Streptococcus Mutans ATCC 25175. • Evaluar la efectividad inhibitoria del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) a la concentración de 50 % frente al Streptococcus Mutans ATCC 25175. • Evaluar la efectividad inhibitoria del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis(romero) a la concentración de 75 % frente al Streptococcus Mutans ATCC 25175. • Evaluar la efectividad inhibitoria de la clorhexidina al 0.12%, frente al Streptococcus mutans ATCC 25175. • Comparar los resultados obtenidos por medición de halos de inhibición generados por el extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) en diferentes concentraciones y la clorhexidina al 0, 12 % frente al Streptococcus Mutans ATCC 25175. 	Si el Rosmarinus Officinalis contiene flavonoides, terpenoides, taninos, entonces es probable que tenga mayor efectividad inhibitoria que la clorhexidina al 0.12% frente al Streptococcus mutans ATCC 25175.	<p>Variable independiente: Extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero)</p> <p>Variable dependiente: Efecto inhibitorio del Rosmarinus officinalis (romero). Frente al Streptococcus mutans ATCC 25175.</p>	<p>Tipo de investigación: Prospectivo, transversal, experimental, comparativo.</p> <p>Muestra: La población de estudio estará conformada por 25 placas petri, con cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.</p> <p>Muestreo: La técnica de muestreo fue no probabilística por conveniencia.</p> <p>Población: Cepa patrón Streptococcus mutans ATCC 25175.</p> <p>Unidad de análisis: Una placa petri inoculada con cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175.</p>