

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
ESTOMATOLOGÍA**

TESIS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE UN
COLUTORIO ELABORADO CON EXTRACTO
ALCOHÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* L.
(romero) SOBRE *Streptococcus mutans* Y
*Enterococcus faecalis***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA**

Autor

Bach. Loja Montoya Madeleine

Asesor

MSc. Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto

Línea de Investigación

**Respuestas biológicas en terapias
estomatológicas**

Pimentel, Noviembre del 2017

**Efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado con extracto
alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus
mutans* y *Enterococcus faecalis***

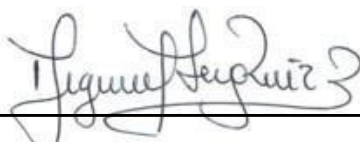
Aprobación de la Tesis

Loja Montoya Madeleine

Autor

Mg. CD. Millones Gómez Pablo Alejandro

Asesor Metodológico



M.Sc. Mblgo. Ruiz Barrueto Miguel Angel

Asesor Especialista

Mg. Mblgo. López López Elmer

Presidente de Jurado

Mblgo. Siadén Ortega Max Roger

Secretario de Jurado



M.Sc. Mblgo. Ruiz Barrueto Miguel Angel

Vocal de Jurado

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida; y ser nuestro motor.

A un angelito maravilloso, Leandro Camilo Cotrina Loja, quien me dio fortaleza y por quien comprendí que en la vida no hay obstáculo alguno para lograr lo que uno se propone.

Pero sobre todo y aunque nunca sepan que los mencioné, va dedicado a mis padres y hermanos, nunca supe lo que era vivir con ellos, pero eso me dio fortaleza y desde pequeña me hizo ver lo que quería para mi vida, no tuve la dicha de tenerlos cerca, pero Dios que es tan grande me regaló mucho más y puedo decir que tengo muchas mamás, muchos papás, tíos (as), amigos; y obviamente también va dedicado a todas esas personas.

AGRADECIMIENTO

A mi tío, Carlos Alberto Fernández Lucana, a mi tía, Carmela Arias Paredes; quienes me apoyaron y alentaron en todo el trayecto de la carrera.

A mi asesor especialista Miguel Angel Ruiz Barrueto, por el apoyo incondicional, por su paciencia, por las palabras de aliento.

A mi asesor metodólogo Pablo Alejandro Millones Gómez, por el apoyo que me brindó durante todas las asesorías.

A mis miembros de jurado, Elmer López López, Max Roger Siadén Ortega, por las recomendaciones que me brindaron para la mejora de este informe.

INDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTO	2
Resumen	5
Abstract	6
INTRODUCCIÓN	7
I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	9
1.2. Formulación del Problema	11
1.3. Delimitación de la Investigación	11
1.4. Justificación e importancia de la Investigación	11
1.5. Limitaciones de la Investigación.....	12
1.6. Objetivos de la Investigación	13
II. MARCO TEÓRICO	14
2.1. Antecedentes de Estudios	14
2.2. Base teórica científicas	17
2.2.1. Situación actual de la salud bucal	17
2.2.2. Enfermedades Pulpo – periapicales	18
2.2.3. Caries Dental	19
2.2.4. Algunos Microorganismos de interés estomatológico	19
2.2.5. Fracaso de Endodoncia	23
2.2.6. Colutorios Odontológicos	24
2.2.7. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	24
2.2.8. Métodos de control de Microorganismos	33
2.2.9. Espectrofotómetro	34
2.3. Definición de la terminología	37
III. MARCO METODOLÓGICO	44
3.1. Tipo y Diseño de Investigación	44
3.1.1. Tipodeinvestigación	44
3.1.2. Diseñodelainvestigación	44
3.2. Población y Muestra	45
3.3. Hipótesis	46
3.4. Operacionalización	46
3.5. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos	49

3.5.1.	Obtención de la planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).	49
3.5.2.	Obtención del extracto alcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).	49
3.5.3.	Determinación de la CMI del colutorio a base de extracto alcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).	50
3.5.4	Determinación de la CMB del colutorio a base de extracto alcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).	50
3.5.5.	Elaboración del colutorio a base de extracto alcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero).	51
3.5.6.	Reactivación de las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	52
3.5.7.	Preparación y estandarización de los inóculos.	53
3.5.8.	Determinación de la sensibilidad antibacteriana de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> a un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> mediante el método de Difusión en disco.	53
3.6.	Procedimiento para la recolección de datos.	54
3.6.1.	Método de difusión en agar	54
3.7.	Análisis Estadístico e Interpretación de los datos	54
3.8.	Criterios éticos	54
3.9.	Criterios de rigor científico	55
IV.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	55
4.1.	Resultados en tablas y gráficos	55
4.2.	Discusión de resultados	63
V.	PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	69
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	700
6.1.	Conclusiones	70
6.2.	Recomendaciones	711
	REFERENCIAS	722
	ANEXOS	76

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. El estudio fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Señor de Sipán. La muestra consistió en 100 uL de colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), una suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se aplicaron dos metodologías. El método de difusión en placa con la cual se determinó la capacidad antibacteriana del colutorio y el método de microdilución en microplaca con el que se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados obtenidos muestran que el colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *R. officinalis* tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* superando al control positivo Gluconato de clorhexidina al 0,12% en más de un 30% de inhibitoria. Así mismo se estableció la CMI y la CMB del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans* la cual fue de 2 mg/mL y 5 mg/mL respectivamente. Para *Enterococcus faecalis* la CMI y la CMB del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* fue de 3 mg/mL y 6 mg/mL respectivamente.

Palabras clave:

Antibacteriano, Colutorio, *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*.

Abstract

This investigation had like an objective to determinate the antibacterial *in vitro* effect of a mouthwash, which was made with an alcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. (romero) on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. The study was made in microbiology lab of “Señor de Sipan” University. The sample was 100 µL of mouthwash, which was made with an alcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. (romero), a bacterial suspension of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* at a concentration of 1.5×10^8 UFC/ml. Two methodologies were applicated: Plate-Diffusion Method, which the antibacterial capacity of mouthwash was determined, and the Microdilution in Microplate Method, which the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. The results show that the mouthwash withan alcoholic extract of R. officinalis had antibacterial effect in vitro versus to *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*, overcoming the positive control of Chlorhexidine gluconate to 0.12% by more than 30% inhibitory. Likewise, the MIC and MBC of the mouthwash, which was made with an alcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. (romero) on *Streptococcus mutans*, were determined in 2 mg/mL and 5 mg/mL respectively. For *Enterococcus faecalis*, the MIC and MBC of the mouthwash, which was made with an alcoholic extract of *Rosmarinus officinalis*, were determined in 3 mg/mL and 6 mg/mL respectively.

Keywords

Antibacterial, Mouthwash, *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries dental es una de las enfermedades multifactorial con mayor prevalencia a nivel mundial. El *Streptococcus mutans* es una de las primeras bacterias colonizadoras de boca, se ha establecido que juega un importante rol en la acidificación del ambiente interno y participa conjuntamente con otros microorganismos orales de la formación de placa bacteriana, además que favorece la aparición y progresión de la caries. Así mismo, existen las infecciones endodónticas persistentes causadas por *Enterococcus faecalis*, que se ha demostrado es capaz de sobrevivir frente a protocolos de irrigación, medicaciones intraconducto y materiales de obturación.^{3, 4, 42, 43, 44, 45.}

Actualmente la medicina natural tiene cada vez más acogida en la población a nivel mundial debido a que los productos utilizados y los procedimientos realizados tienen pocos o nulos efectos colaterales, es por ello que se está investigando el uso de alternativas terapéuticas que un futuro cercano puedan reemplazar a las terapias tradicionales que han perdido efectividad y generan efectos colaterales. Estudios recientes establecen que la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. planta conocida como romero posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes debido a que son fuentes ricas en compuestos fenólicos con alta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y bacterias

Gram negativas.

En la actualidad uno de los métodos más comunes de control de microorganismos de importancia estomatológica es el uso de colutorios o enjuagues bucales, constituidos principalmente de principios activos de origen netamente químico, lo que contribuye a su elevado costo y en algunos casos a

efectos adversos como alteración de la flora oral, inflamación de las mucosas y resistencia microbiana, es por ello que los estudios en el área de la odontología están orientados a reemplazar los componentes netamente químicos consustancias naturales o compuestos bioactivos de origen vegetal o microbiano.

Por ello en la presente investigación se planteó como objetivo determinar el efecto *in vitro* un colutorio con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, obteniéndose que un colutorio con una concentración de extracto de 10 mg/mL de extracto alcohólico de romero tiene efecto bactericida *in vitro* sobre *S. mutans* y *E. faecalis*. Así mismo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del colutorio a base de extracto de romero para *S. mutans* y *E. faecalis*.

I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Situación Problemática

La caries dental es una enfermedad multifactorial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y cerca del 100% de los adultos tienen caries dental, a menudo acompañada de dolor o sensación de molestia. La prevalencia de estas enfermedades varía dependiendo de la región geográfica y de la disponibilidad y accesibilidad a los servicios de salud bucodental.

También tienen mucha influencia diversos determinantes sociales.¹

La prevalencia de enfermedades bucodentales está aumentando en los países de ingresos bajos y medianos; en todos los países, la carga de morbilidad por esta causa es considerablemente mayor en las poblaciones pobres y desfavorecidas, en el Perú, según el Ministerio de Salud, 98 de cada 100 peruanos presentan caries.

El MINSA ha reportado que la enfermedad periodontal presenta una prevalencia del 85% en nuestro país, siendo un problema de salud pública que el estado debe priorizar, pues según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) somos un país en estado de emergencia a nivel de salud bucal.²

La caries dental es una enfermedad multifactorial. El *Streptococcus mutans* es una de las primeras bacterias colonizadoras de boca, juega un importante rol en la acidificación del ambiente interno del biofilm, favoreciendo a la aparición y progresión de la caries. Por otra parte, *Enterococcus faecalis* es el microorganismo preponderante en las infecciones endodónticas persistentes, que es capaz de sobrevivir frente a protocolos de irrigación, medicaciones intraconducto y materiales de obturación.^{3, 4}

En la actualidad existen agentes antimicrobianos como ingredientes de colutorios, que inhiben químicamente la formación o proliferación de la placa. Entre estos está la clorhexidina al 0,12 %, como el agente más utilizado en el medio dada su eficacia en la eliminación de microorganismos cariogénicos; desafortunadamente presenta efectos secundarios adversos,

como disgeusia y tinción dental, razones que limitan su utilización. Cabe resaltar entonces que el hallazgo del agente antiplaca ideal aún constituye un reto para los investigadores.⁵

Rosmarinus officinalis L. (romero), es una planta aromática conocida y utilizada antiguamente con fines medicinales. Estudios recientes le otorgan propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Se ha descrito que las hojas de romero son fuentes ricas en compuestos fenólicos con alta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Su alto porcentaje de actividad antimicrobiana se le atribuye al ácido carnósico y carnosol.

1.2. Formulación del Problema

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*?

1.3. Delimitación de la Investigación

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud (FACCSA), Universidad Señor de Sipán (USS), ubicada en carretera a Pimentel Km 5, Distrito de Pimentel, Provincia de Chiclayo, Departamento de Lambayeque, durante los meses de abril diciembre del 2016. La cepa bacteriana utilizada estuvo constituida por un cultivo de *Streptococcus mutans* proporcionado por el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Microbiología y Parasitología de la

Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Dicha cepa fue corroborada fenotípicamente en el Laboratorio de Microbiología de la FACCSA – USS y en el sistema automatizado *Microscan* del Hospital Regional de Lambayeque. Las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) para la obtención del extracto fueron obtenidas de la Unidad Experimental de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNT e identificada en el *Herbarium Truxillense* de la misma universidad.

1.4. Justificación e importancia de la Investigación

En la actualidad uno de los métodos más comunes de control de microorganismos de importancia estomatológica es el uso de colutorios o enjuagues bucales, constituidos principalmente de principios activos de origen netamente químico, lo que contribuye a su elevado costo y en algunos casos a efectos adversos como alteración de la flora oral, inflamación de las mucosas y resistencia microbiana, es por ello que en el área de la odontología se agrega sustancias naturales como componentes de enjuagues bucales.

Países como Brasil y Ecuador desarrollan investigaciones con extractos alcohólicos vegetales con aplicación odontológica, sin embargo en nuestro país y específicamente, en Chiclayo, pese a la diversidad botánica con la cual contamos, existen pocas investigaciones que estudien las propiedades antimicrobianas de plantas naturales, a nivel de salud oral. Es así, que disponiendo de los recursos humanos y materiales, es viable realizar una

investigación sobre el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L.

(romero) sobre *S. mutans* y *E. faecalis*.

1.5. Limitaciones de la Investigación

Se presentaron algunas limitaciones en la presente investigación:

La dificultad para cultivar y mantener viable la cepa de *Streptococcus mutans* debido a los requerimientos nutricionales y a las condiciones de anaerobiosis.

Dificultad para adquirir algunos componentes de la formulación del colutorio debido a su alto costo.

1.6. Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* mediante el método de difusión en disco.
2. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco.

3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) mediante el método de Microdilución.
4. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) mediante el método de Microdilución.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de Estudios

Brito M., Nobre S., et al. (2012) en Brasil; se realizó un estudio, el cual evaluó la actividad antibacteriana del extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y su potencial para la desinfección de los conos de gutapercha (GP). En el primer experimento, un extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (hojas) en una relación de dilución de 10% m/v se ensayó frente a *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco. Los controles positivos y negativos fueron del 70% de alcohol y los antibióticos, respectivamente.¹³

Los procedimientos se realizaron por triplicado, y los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento se midieron con un calibrador después de 24 horas a 37 °C. En el segundo experimento, los procedimientos de desinfección se evaluaron en los conos GP contaminados artificialmente con *E. faecalis*. El extracto de *R. officinalis* se comparó con gluconato de clorhexidina al 2% e hipoclorito de sodio al 2,5%, usando una prueba de exposición directa (5 min de tratamiento).¹³

Esterilizados y conos no desinfectados se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Después de 24 horas de incubación, se tomaron los recuentos bacterianos. Para ambos experimentos, los datos fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Tukey ($p < 0,05$) de Kruskal-Wallis y. El extracto de la planta produjo zonas de inhibición comparables a los de los antibióticos probados. Significativa la desinfección de cono GP se verificó con todas las soluciones desinfectantes, sin diferencias significativas entre ellos. *Rosmarinus officinalis* extracto mostró un efecto bactericida sobre *Enterococcus faecalis* y la capacidad para desinfectar conos GP contaminado con ella.¹³

Solano X. (2016) en Quito – Ecuador; se realizó un estudio para saber si existe inhibición de crecimiento bacteriano *in vitro* de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos: acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero), aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco. El estudio se realizó bajo las condiciones de un diseño experimental, utilizando controles: positivo Clorhexidina al 0.12% y negativo agua destilada, se realizaron 15 repeticiones para cada extracto en concentraciones de 1,5 y 3% para el extracto acuoso y 50% para el extracto oleoso.⁴

Para la evaluación antimicrobiana de los extractos se utilizó una cepa estandarizada del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y se empleó la técnica de difusión en medio sólido, en la cual se impregnaron 20 μ L de

cada sustancia en discos de papel filtro y se incubaron a 37°C por 48 horas. De acuerdo a los resultados, el extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93mm de halos de inhibición, mientras que los extractos acuosos no produjeron halos de inhibición.⁴

Estévez H. (2016) en Quito – Ecuador; se realizó un trabajo de investigación, el cual pretendió comprobar la efectividad de inhibición de los extractos de Tomillo y Romero (al 10%) frente al *Streptococcus mutans*, principal agente causante de caries dental. Se realizó el análisis *in vitro* de 20 muestras, al interior del Laboratorio SAFEM ubicado en el Barrio 6 de Diciembre, Caccha N3-257 y Princesa Toa, de la ciudad de Quito. Se midieron los halos de inhibición formados por ambas soluciones acuosas, además de la clorhexidina al 2% y agua destilada.¹⁵

Sobre la base fundamental del análisis estadístico a partir del Análisis de Varianza de un factor (ANOVA) y la Prueba de Tukey, en contraste con los resultados de estudios precedentes, se refutó la hipótesis planteada inicialmente. Se concluyó entonces que ninguno de los extractos de las mencionadas plantas, al menos al 10% equivalente a la concentración lograda en preparados caseros, consigue prevenir o detener la aparición e incidencia de la bacteria en cuestión.¹⁵

Hidalgo P. (2016) Quito – Ecuador; se realizó un estudio, cuyo propósito fue evaluar mediante un estudio *in vitro*, el efecto antimicrobiano de los extractos de las hojas de tomillo y de las pepas de ajo sobre la cepa de *Enterococcus faecalis*, siendo el causante de la infección de los

conductos radiculares en dientes con fracaso endodóntico. La obtención de los extractos hidroalcohólicos se realizó por el método de percolación, luego se procedió a sembrar la bacteria en las 16 cajas Petri de Agar Mueller Hinton, posteriormente se colocaron los discos de papel filtro embebidos con 20 ul de los extractos, las cajas Petri fueron incubadas por 24 horas a 37°C y se procedió a la medición de los halos de inhibición luego de las 24 horas. Los resultados obtenidos fueron analizados con las pruebas estadísticas de Kruskal Wallis y la de U de Mann Whitney, concluyendo que el extracto de tomillo al 75 y 100% no tuvo ningún efecto sobre la bacteria, pero el extracto de las pepas de ajo al 100% tuvo un efecto límite frente al *Enterococcus faecalis*.¹⁶

2.2. Base teórica científicas

2.2.1. Situación actual de la salud bucal

La caries dental y las enfermedades periodontales han sido históricamente consideradas como los problemas más importantes a nivel mundial.²⁹ En la actualidad, la distribución y severidad de las enfermedades bucodentales varía en diferentes partes del mundo y dentro de los mismos países o regiones. El significativo papel que juegan los factores socio conductuales y ambientales en las enfermedades bucales y la salud ha sido demostrado en numerosos estudios epidemiológicos.^{29, 30}

En muchos países en vías de desarrollo, el acceso a los servicios dentales de salud es muy limitado y los dientes son dejados sin tratamiento o son extraídos debido al dolor o incomodidad.

Globalmente, la mayoría de los niños presentan signos de gingivitis y entre los adultos, los estados iniciales de las enfermedades periodontales son muy prevalentes. La prevalencia de periodontitis severa se presenta entre el 5 y el 15% de la población adulta. La periodontitis juvenil o de inicio temprano afecta a aproximadamente al 2% de los jóvenes.³² El tratamiento para los problemas bucodentales se estima que es alrededor del 5-10% de los costos en salud en los países industrializados y es insuficiente en muchos países en desarrollo.³³

2.2.2. Enfermedades Pulpo – periapicales

El factor etiológico más importante de la inflamación pulpar y periapical es la invasión bacteriana o de factores derivados de las bacterias en el interior de la pulpa. La vía de entrada de las bacterias hacia la pulpa puede ser por caries, fractura del esmalte, dentina expuesta o por restauraciones sin ajuste.³⁶

La caries es una enfermedad microbiana que afecta los tejidos calcificados de los dientes así como a la pulpa los productos de las bacterias como ácidos orgánicos y enzimas proteolíticas destruyen al esmalte y a la dentina y se ha demostrado que la exposición de la pulpa a los productos bacterianos en la dentina puede estimular una respuesta inflamatoria en pulpa.³⁷ En el diente las bacterias

que han invadido esmalte y dentina pueden crecer y multiplicarse sin haberse iniciado la defensa por medio del huésped y es solo hasta que las bacterias invaden pulpa cuando se vuelven vulnerables a los mecanismos de defensa a través de la respuesta inflamatoria y a los mecanismos inmunes.³⁸

2.2.3. Caries Dental

La caries dental es una enfermedad infecciosa y transmisible de los dientes, que se caracteriza por la desintegración progresiva de sus tejidos calcificados, debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta. Como resultado, se produce la desmineralización de la porción mineral y la disgregación de su parte orgánica.⁴⁰ Como toda enfermedad de etiología multifactorial, la búsqueda del consenso respecto a los agentes que la ocasionan viene demandado un lapso sumamente extenso, que aún, no ha sido agotado al iniciar el año 2005, momento en que se edita esta obra.⁴⁰

2.2.4. Algunos Microorganismos de interés estomatológico

Los microorganismos que conforman lo que se denomina flora de la saliva son todos los que se han desprendido de los sitios diversos de la cavidad bucal en donde se han asentado poblaciones bacterianas (piezas dentarias, lengua, mucosa de los carrillos y membranas mucosas de la faringe).³⁵

En general predominan los cocos Gram positivos anaerobios facultativos (en torno al 44 %), los cocos Gram negativos

anaerobios estrictos como *Veillonella* sp. (Alrededor del 15 %), y los bacilos anaerobios facultativos Gram positivos

(aproximadamente un 15 %), destacando las especies de *Actinomyces*. También treponemas comensales, hongos como *Candida* sp. y otros.³⁶

2.2.4.1. *Streptococcus mutans*

Los Estreptococos son microorganismos sumamente difundidos y la cavidad bucal alberga gran número de especies de este género. Estos gérmenes, que hasta hace poco se denominaban "cocos piógenos", pueden provocar distintas patologías como consecuencia de sus productos o por el hecho de ser bastante resistentes a la fagocitosis.⁵

Los Estreptococos tienen forma esférica y están agrupados en cadenas de longitud variable. Cada uno de los elementos aisladamente tiene un diámetro que oscila entre 0.6 y 1 a 2 μm . En ocasiones adquieren el aspecto de diploestreptococos. Las formaciones en cadena son consecuencia de que los microorganismos permanecen adheridos por una parte de la pared celular.⁵ Los Estreptococos son gram-positivos, son inmóviles, presentan prolongaciones extracelulares del tipo de las fimbrias y pueden tener cápsula. Son catalasa-negativos; se comportan como anaerobios facultativos o estrictos, pero según los productos de las reacciones de óxido-reducción, se

comprueba que son fermentadores produciendo ácido láctico.¹

El *Streptococcus mutans* presenta diferentes características que son determinantes en su cariogenicidad, entre éstas tenemos: la producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, en especial los glucanos insolubles que son muy importantes en la colonización y mantenimiento de esta bacteria sobre el diente; posee elementos que determinan fenómenos de adhesión, agregación y congregación; la producción y metabolización de polisacáridos intracelulares, lo que le permite obtener energía y producir ácido durante largos períodos de tiempo; rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos; poder acidógeno, acidófilo y acidúrico; también puede conseguir un pH crítico para la desmineralización del esmalte de manera más rápida que otro microorganismo de la placa.⁵

Una de las capacidades del *Streptococcus mutans* es sintetizar polisacáridos extracelulares de sacarosa, los mismos que garantizarán la adhesión a superficies dentarias. Así como también la capacidad de generar sustratos de reserva mediante la producción de

polisacáridos intracelulares. Una de sus características que lo hace más virulento es su capacidad para producir ácido, como el ácido láctico y su supervivencia en un pH bajo.⁹

2.2.4.2. *Enterococcus faecalis*

El *Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, no esporulada, el tamaño celular oscila entre 0,5 y 0,8 μm , se asocian en pares o cadenas cortas. Sus factores de virulencia no son muy bien conocidos y su hábitat natural es el tracto gastrointestinal humano. Puede ser aislado de la cavidad oral.^{1, 2}

La temperatura óptima de crecimiento in vitro de este microorganismo es de 35°C; no obstante, se ha observado su crecimiento entre 10°C y 45°C. El *Enterococcus faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la bacteria y que contiene residuos de glicerol. Además, posee gran cantidad de mureína y ácido teicoico.^{2, 3}

Una característica notable de *Enterococcus faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias. Esta capacidad de resistencia, está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento

endodóntico, debido a que son capaces de suprimir la acción de los linfocitos. De allí que se afirme que el *Enterococcus faecalis* presenta una prevalencia de 24% a 77% en dientes mayormente asociados con el fracaso endodóntico.

El *Enterococcus faecalis* influye en la agregación y producción extracelular de superóxido y citolisinas tóxicas; capacidad para el intercambio de material genético que le permite penetrar en los conductos dentinarios. Al igual que la *Cándida albicans*, este microorganismo tiene gran variedad de factores de virulencia que le confieren la capacidad de sobrevivir incluso en la región periapical; es una bacteria que constituye un patógeno oportunista implicado en la presencia de la infección, influyendo en el pronóstico del tratamiento de conductos.⁴

2.2.5. Fracaso de Endodoncia

La incidencia de Fracazos Endodónticos ha hecho que el especialista en Endodoncia trate de determinar cuál es el tratamiento de primera elección para solucionar estas complicaciones. Teniendo en cuenta los conceptos y fundamentos básicos de la patología endodóntica y el rol que tiene la presencia bacteriana en la formación de la misma, se tiene como primera opción para solucionar estos fracasos al Retratamiento. El criterio más utilizado para determinar un fracaso endodóntico es la presencia o persistencia de una sombra radiolúcida a nivel

periapical. La valoración clínica como radiográfica son criterios inseparables para el análisis de un posible fracaso endodóntico. Otros factores que podemos tener en cuenta durante esta valoración serían la presencia de filtración coronal, defectos de obturación y la presencia o persistencia de sintomatología (fístula o dolor).⁴

2.2.6. Colutorios Odontológicos

Los colutorios se vienen usando desde hace siglos para ayudar a preservar la salud oral. Son preparaciones líquidas que pueden tener las siguientes funciones: antiséptica, astringente, analgésica, antibiótica, antifúngica e antiinflamatoria.

Pero entre todas ellas destaca su utilidad para combatir la caries y la enfermedad periodontal a través del control de la placa bacteriana. Los fluoruros y la clorhexidina son los agentes terapéuticos más importantes de los colutorios en la actualidad.

2.2.7. *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

2.2.7.1. Historia

La historia del romero está relacionada con su origen; en las áreas secas y rocosas cerca de la costa del Mediterráneo. Su nombre ha sido derivado de los vocablos griegos rhus y myrinos que se traducen como "arbusto aromático" y el nombre específico se le ha atribuido al uso medicinal.¹⁷

El romero es una planta medicinal ya conocida desde la antigüedad, su valor estaba determinado por las creencias

propias de cada cultura y época. Así por ejemplo para los griegos el romero era considerado como afrodisíaco, siendo consagrado a Afrodita la diosa del amor: también representaba un símbolo de la eternidad de la vida e inmortalidad.¹⁸ Los eruditos griegos para ayudar a su memoria durante exámenes, solían llevar una guirnalda de la hierba sobre sus cabezas. Para los romanos al igual que los griegos el romero representaba una hierba sagrada, se utilizaba como amuleto en las bodas, símbolo de fidelidad entre novios y para alejar el mal de ojo o romper la envidia, de la misma manera conocidas ya sus propiedades medicinales fue utilizado en la época Medieval para purificar habitaciones de enfermos, o como sahúmo.¹⁹

Se ha mencionado que hace miles de años atrás, los egipcios utilizaron romero como parte de sus ritos. Se encontraron rastros de la planta en sus tumbas.²⁰ Además de las múltiples propiedades medicinales que se le atribuyeron al romero, también fue utilizado para elaboraciones de cosméticos, como colonias de uso exclusivo para la clase real.

2.2.7.2. Identificación Botánica

Su nombre científico es *Rosmarinus officinalis* L., de la familia Lamiaceae. Phylum: Euphyta. División: Angiospermae.

Pertenece a la clase: Dicotyledones, orden: Tubiflorae, género: *Rosmarinus* y de especie: *Rosmarinus officinalis*.¹⁸

2.2.7.3. Descripción Botánica

El romero conocido también popularmente como romero de olor, romero de jardín, romero real o romero, es un arbusto perenne de aproximadamente 1 metro y medio de altura, con hojas lineales coriáceas de forma tubular, con aroma fuerte y agradable, así lo han mencionado varios autores entre ellos.¹⁹ Con un tallo leñoso y ramificado, posee flores de color azul pálido lila, raramente blancas o rosas que se encuentran en conjunto, tienen un estilo alargado y florecen durante todo el año.^{17, 18}

2.2.7.4. Hábitat y Distribución Geográfica de *R. Officinalis*

Su hábitat corresponde a espacios como laderas o territorios montañosos, dado que es una especie termófila requiere de un clima templado o templado-cálido.¹⁷ Crece en terrenos calcáreos, pedregales o arenosos y con muy poca humedad, acompañado de otras plantas aromáticas como el tomillo.¹⁸ Originario de la zona mediterránea, se encuentra distribuido sobre todo en el sur de Europa, norte de África, suroeste de Asia y otras variedades en el sur y este de la Península Ibérica; siendo España, ex Yugoslavia y Túnez los principales países productores.¹⁷ Sin embargo en la actualidad el romero está distribuido en otras partes del mundo, como en Latinoamérica, entre ellos, países como Ecuador (en la zona andina) y Perú.^{21,22}

2.2.7.5. Composición de *Rosmarinus officinalis*

Autores han identificado algunos compuestos encontrados en las hojas, flores y tallos del romero, compuestos que se detallan en la siguiente tabla.^{17, 23}

Tabla 1. Composición química del *R. Officinalis*

COMPOSICIÓN DE *Rosmarinus Officinalis* (romero)

GRUPO	COMPONENTES	PARTE DE LA PLANTA
F	Aceite Esencial (1-2.5%) Alcanfor, 1,8 cineol, a-pipeno, monoterpenos como borneol, b- pipeno, limoneno, cimeno, acetato de bornilo, cafeno, a-terpineol, cariofileno, eucalipto.	flores, tallos y hojas
U	Carnosol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol, isorosmanol, 7-metoxirosmanol, rosmadial	Hojas Lactonas sesquiterpénicas
E	Ácidos fenólicos Ácido rosmarínico, cafeico, clorogénico, labiático	Hojas
N	Flavonoides Nepetina, nepitrina	hojas, flores y tallos
E	Acidostriterpénicos Ácido ursólico, ácido oleánico	Hojas
:	Alcoholes triterpénicos Alfa y beta amirina	Hojas
S	Minerales Potasio, magnesio, zinc, cobre	hojas, flores y tallos
t	Taninos	flores, frutos y tallo
u	Saponinas	Hojas

bbot. 2002; Biosalud, 2009; Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (2013).¹⁸

2.2.7.6. Principios Activos de *Rosmarinus officinalis* (romero)

Se conoce como principios activos aquellas sustancias producidas por la planta que intervienen en la actividad medicinal de la misma. En el romero se han descrito que la mayor parte de los principios activos se obtienen de sus hojas, y gran parte está representada por el aceite esencial. Se han identificado también otros compuestos como terpenoides, flavonoides y ácidos fenólicos, que intervienen en las propiedades farmacológicas de la planta, descritos a continuación.²⁴

A. Taninos: Corresponde a un compuesto amargo que produce la planta, con la finalidad de autoprotección del medio externo. Este compuesto le da la característica de astringencia al romero.²⁵ Se menciona que su acción terapéutica antimicrobiana, estimulación fagocítica y actividad antitumoral se relaciona con su capacidad de inactivar adhesinas, así como enzimas y proteínas de transporte de las bacterias.²⁶

B. Flavonoides: Se trata de pigmentos vegetales no nitrogenados que intervienen en la respuesta adaptativa y protectora de la planta contra los rayos ultravioleta, además

de atraer a los polinizadores.²⁵ Su actividad antimicrobiana probablemente se relaciona con la formación de complejos con proteínas solubles, extracelulares y con células de la pared bacteriana, que destruyen la misma, todo esto como respuesta a la infección microbiana.²⁶

C. Aceites esenciales: Es uno de los principios activos del *Rosmarinus officinalis*, responsable de la mayor parte de acción medicinal de la planta. Se obtiene de las hojas, flores y tallos.²⁴ Forma parte del grupo de los terpenoides y se ha descrito que su acción terapéutica antiséptica y antimicrobiana radica en sus componentes, especialmente el alfa pipeno, alcanfor, 1,8 cineol o eucaliptol, limoneno, verbenona, canfeno y borneol. Se ha demostrado acción antimicrobiana del aceite de romero frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.²³ Así como también hongos y virus y protozoos.²⁵

D. Triterpenos: Se trata de compuestos lipofílicos, siendo los principales: ácido ursólico y ácido oleánico; alcoholes triterpénicos como alfa y beta-amirina.¹⁷ Su acción antimicrobiana se relaciona con la capacidad de romper la membrana celular de las bacterias.²⁵

2.2.7.7. Propiedades Medicinales de *R. officinalis*

Varias propiedades medicinales se le ha atribuido al romero, la mayoría de ellas comprobadas mediante estudios *in vivo* con animales o *in vitro*, mediante estos ensayos se conoce de manera general que el romero presenta acción hiperglucemiante (aumenta niveles de glucosa en sangre), antiséptica, fungistática, emenagoga (que estimula flujo sanguíneo en la pelvis y en el útero), colerética (activa la producción de la bilis), estimulante del sistema nervioso central, antiinflamatorio, cicatrizante, analgésico entre otros, descritos a continuación.²⁴

A. Efectos antiinflamatorios: Se relaciona la acción antiinflamatoria con el ácido rosmarínico, ya que en estudios experimentales mediante la aplicación tópica de extractos metanólicos de romero en ratones ha demostrado reducir el edema e inhibir anafilaxis cutáneas.²⁷

B. Efectos antioxidantes: Se ha determinado mediante ensayos *in vitro* que compuestos como el rosmanol, carnosol y ácido carnosólico presentan un efecto antioxidante frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.²⁸

C. Efectos antiespasmódicos y anticonvulsivantes: En

vías biliares e intestino delgado se le atribuyen al aceite esencial de romero, efectos antiespasmódicos, que han sido comprobados mediante estudios experimentales realizados en animales como conejos y cobayos al administrar noradrenalina; así también al administrar extracto acuoso en ratones se comprobó el efecto anti convulsionante, además se considera inotropa positiva, es decir aumenta la fuerza de los latidos cardíacos.²⁷

D. Efecto antimicrobiano: Se asocia la actividad anti fúngica y bactericida al aceite esencial de romero. Mediante ensayos *in vitro* se ha determinado susceptibilidad de bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias que de interés alimentario, así también bacterias como *Clostridium perfringens* presentaron inhibición frente a extractos obtenidos del romero. También se ha mencionado la susceptibilidad de la bacteria *Salmonella typhi* frente a un extracto acuoso de romero.^{29, 30}

E. Actividad antiviral: “El ácido carnosólico inhibe la actividad enzimática del virus HIV-1. En estudios realizados *in vitro* ha demostrado el extracto seco de romero inhibir la formación del virus Herpes simple tipo uno”.¹⁷

2.2.7.8. Actividad Antimicrobiana de *R. officinalis* en odontología

Existen muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana del romero, la mayoría realizados *in vitro*, y con especies bacterianas enfocados en biotecnología, pero existen pocos estudios probados con bacterias de interés odontológico.

Brasil ha sido uno de los países que mayor atención ha prestado en cuanto a la introducción de fitoterapia en Odontología, se evaluó mediante un estudio *in vitro*, la acción antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* en extracto hidro-alcohólico, frente a bacterias orales planctónicas como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus casei* mostrando resultados favorables para las especies ensayadas a excepción del *Streptococcus mitis*.³¹

El aceite esencial de romero en concentraciones elevadas presenta actividad anti-adherente y cambios morfológicos para hongos como *Cándida albicans*.³²

En Perú se han realizado estudios un poco más específicos, para determinar la acción antibacteriana del romero en extractos alcohólicos en bacterias Gram negativas aisladas de pacientes con periodontitis crónica, mostrando resultados positivos en concentraciones máximas del romero.³³

2.2.8. Métodos de control de Microorganismos

2.2.8.1. Método de difusión en placa

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de CLSI, de Estados Unidos.

El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia.

2.2.8.2. Método de Microdilución

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de

la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático.

2.2.9. Espectrofotómetro

La palabra espectrofotómetro se deriva de la palabra latina spectrum, que significa imagen, y de la palabra griega phos o photos, que significa luz. El espectrofotómetro, construido mediante procesos avanzados de fabricación, es uno de los principales instrumentos diagnósticos y de investigación desarrollados por el ser humano. Utiliza las propiedades de la luz y su interacción con otras sustancias, para determinar la naturaleza de las mismas.

En general, la luz de una lámpara de características especiales es guiada a través de un dispositivo que selecciona y separa luz de una determinada longitud de onda y la hace pasar por una muestra. La intensidad de la luz que sale de la muestra es captada y comparada con la intensidad de la luz que incidió en la muestra y a partir de esto se calcula la transmitancia de la muestra, que depende de factores como la concentración de la sustancia. Es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas.

Un espectrofotómetro es un instrumento que tiene la capacidad de manejar un haz de Radiación Electromagnética (REM), comúnmente denominado luz, separándolo en facilitar la identificación, calificación y cuantificación de su energía. Su eficiencia, resolución, sensibilidad y rango espectral, dependerán de las variables de diseño y de la selección de los componentes ópticos que lo conforman. Se usa en el laboratorio con el fin de determinar la concentración de una sustancia en una solución, permitiendo la realización de análisis cuantitativos.

2.2.9.1. Componentes del Espectrofotómetro

El esquema que se presenta a continuación describe la interrelación de los diversos componentes de un espectrofotómetro. Los más importantes son los siguientes: La fuente luminosa, el monocromador, el portador de muestras, el sistema detector y el sistema de lectura.

Se recuerda que los componentes mencionados corresponden a los básicos o generales de este instrumento y no a los que hayan sido incorporados por diversos fabricantes como consecuencia del avance tecnológico. Una breve explicación de los mismos se encuentra a continuación del esquema.

Los espectrofotómetros, en general, son equipos muy especializados y costosos. Su conservación depende en gran

medida de la forma de instalación y utilización. El medio ambiente que los rodea y la calidad de los servicios de electricidad constituyen factores de primordial importancia, para que los equipos puedan prestar los servicios de acuerdo con las especificaciones para los que fueron fabricados.

Las rutinas de mantenimiento que pueden llegar a requerir varían en complejidad, van desde la limpieza cuidadosa de sus componentes hasta procedimientos especializados, que solo deben realizar técnicos o ingenieros que hayan recibido la capacitación correspondiente y dispongan de la información técnica desarrollada por los fabricantes y que se ajustan a los distintos modelos y diseños disponibles.

La utilización, siguiendo las instrucciones del fabricante, y el uso cuidadoso garantizarán una vida útil, prolongada y muchos años de servicio. En equipos de fabricación reciente, los productores han incorporado rutinas automáticas de calibración y verificación del estado de los componentes que lo integran.

El Espectrofotómetro UV/visible (ANEXO 2), es marca único, modelo: "S-2100UV+" y su procedencia, de Estados Unidos de América. Cuyas características son, que es un espectrofotómetro digital completamente programable, de rango de longitud de onda de 200 a 1000 nm, su precisión es

de ± 2 nm. Su ancho de banda es 4 nm, el rango fotométrico: 0% T a 125% T; -0.3 a 2.5 A; -9999 a 9999. Repetibilidad fotométrica es ± 0.003 A a 0.5 A. Su pantalla digital LCD (4 líneas x 20 caracteres). Los puertos de comunicación USB y RS-232. Tiene memoria con capacidad hasta 200 curvas estándar. Su función de Auto calibración. Se puede programar hasta 200 métodos de prueba e incluye sujetador de cubetas para 4 posiciones, 4 cubetas de vidrio y 2 cubetas de cuarzo. Sus dimensiones son de 42 x 34 x 18 cm y su peso es 10 kg.

2.3. Definición de la terminología

Aerobio. Organismo que crece en presencia de oxígeno. En microbiología es aquel microorganismo que sólo puede vivir en atmósfera de aire y en contacto con oxígeno.⁷

Agente Biológico. Microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.⁷

Antibiótico. Literalmente destructor de la vida. Término que comprende todas las sustancias antimicrobianas independientemente de su origen, ya sean derivadas de microorganismos (bacterias, hongos, etc.), de productos químicos sintéticos o de ingeniería genética.⁷

ATCC: American Type Culture Collection.⁸

Bacteria. Son organismos procariotas. Están constituidos por una célula que contiene los dos tipos de ácido nucleico. Su ADN se encuentra organizado en un cromosoma circular disperso en el citoplasma que contiene muy pocas estructuras u orgánulos útiles para su desarrollo. Las bacterias pueden disponer de hasta tres envolturas: la membrana citoplasmática, la pared bacteriana y la cápsula.^{7, 8}

Bacteria Gram positivo. Bacteria que frente a la tinción de Gram queda coloreada con un tinte azul violáceo. En este tipo de bacterias la pared celular está formada principalmente por peptidoglicano y carece de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.⁷

Bactericida. Con capacidad para matar bacterias.⁷

Bacteriostático. Con capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano, pero sin matar las bacterias.⁷

Cepa. Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.⁸

Coco. Bacteria esférica.⁷

Colonia. Población de bacterias que puede observarse macroscópicamente y que crecen en un medio sólido. Todos los

individuos proceden de una sola bacteria y son el resultado del crecimiento exponencial.⁷

Concentración: En una disolución, relación que existe entre la cantidad de sustancia disuelta (soluto) y la del disolvente.⁸

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.⁸

Cultivo. Crecimiento de microorganismos o células vivas en un medio artificial controlado.⁷

Cultivo puro. Cultivo que contiene un único tipo de microorganismo.

Se obtiene tras varios aislamientos sobre medio sólido.⁷

Disco de sensibilidad: Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.⁸

Efecto: Del latín *effectus*. Aquello que sigue por virtud de una causa. RAE.⁷

Escala de Mc. Farland: Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.⁸

Especie. Categoría taxonómica. Cada uno de los grupos en que se divide un género de acuerdo con las características morfológicas. Unidad básica de clasificación biológica que se define como grupo de organismos que presentan las mismas características genéticas y/o fisiológicas, capaces de entrecruzarse y de producir descendientes fértiles.⁷

Estéril. Libre de organismos vivos y de formas resistentes de vida.⁸

Extracto: Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología.⁸

Facultativo. Indica que un organismo es capaz de crecer tanto en presencia como en ausencia de un factor ambiental.⁷

Flora microbiana. Conjunto de microorganismos típicos en un ecosistema. En el cuerpo, por ejemplo, la flora gastrointestinal o la bucofaríngea.⁷

Halos de inhibición: Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el microorganismo.⁸

Hongos. Organismos eucariotas, aerobios. Se alimentan de materia orgánica y no dependen de la luz para obtener energía. Presentan

paredes celulares rígidas. Se presentan en dos formas: unicelulares o Levaduras y pluricelulares o mohos u hongos filamentosos. La multiplicación es principalmente asexual, aunque algunos grupos también presentan reproducción sexual.⁷

Incubación: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.^{7, 8}

Infecioso, agente. Organismo con capacidad de propagar la enfermedad.⁷

Inóculo: Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.⁸

In vitro. Fuera del organismo vivo. Ocurre en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o cultivo de laboratorio.⁷

Medio de Cultivo: En microbiología medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro.⁸

Microaerófilico: Organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de una tensión de 5% de oxígeno, 10% de anhídrido carbónico y 85% de nitrógeno.⁸

Microorganismo. Toda entidad microbiológica, celular o no, capaz de reproducirse o de transferir material genético.⁷ **Patógeno.** Productor o causante de enfermedad.⁷

Principio Activo. Componente responsable de las propiedades farmacológicas o tóxicas de una sustancia.⁸

Resistente (R): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.⁸

Sensible (S): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.⁸

UFC: Unidad formadora de colonias.⁸ Unidad en que se expresa el número de microorganismos cultivables. Una unidad formadora de colonia puede originarse de un único microorganismo, del agregado de varios microorganismos o de uno o varios microorganismos unidos a una partícula.⁷

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y Diseño de Investigación

3.1.1. Tipo de investigación:

Cuantitativo.

3.1.2. Diseño de la investigación:

Según la intervención del investigador: Experimental

Según la planificación de la medición de la variable de estudio:

Prospectivo

Según el número de mediciones de la variable de estudio:

Transversal

Según el número de variables de interés (analíticas): Analítico

Según el diseño de experiencias: Estímulo creciente

Grupo Control:

A → Negativo → A

A¹ → Positivo: Estímulo validado → A^k

Grupos Experimentales:

A1 Estímulo intensidad x → A1⁻¹

A2 Estímulo intensidad x/2 → A2⁻²

3.2. Población y Muestra

Población

- 100 ml de un colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*.
- 1 cultivo puro de *Streptococcus mutans* proporcionado por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo.
- 1 cultivo puro de *Enterococcus faecalis* proporcionado por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo.^{42, 43, 44, 45}

Muestra

- 100 uL de colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. "romero".
- Una suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.
- Una suspensión bacteriana de *Enterococcus faecalis* a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

Cálculo de las unidades experimentales

El número de duplicados para cada ensayo se determinó aplicando la siguiente fórmula estadística que es aplicable en investigaciones experimentales para determinar el número mínimo de observaciones, duplicados y repeticiones:

$$n = \frac{W - W^2 \cdot (Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha})^2}{W^2}$$

Donde,

n = Número mínimo de muestras, observaciones o réplicas que deben efectuarse en el estudio.

Z α = Valor correspondiente al nivel de confianza asignado (Riesgo de cometer un error tipo I).

Z β = Valor correspondiente al poder estadístico o potencia asignada a la prueba (Riesgo de cometer un error tipo II). W = Rendimiento mínimo esperado, eficiencia mínima esperada o diferencia mínima observable.

Así, Z α = 1.96; Z β = 0.842; W = 0.80 (80%)

Reemplazando la ecuación propuesta se obtuvo que el número mínimo de duplicados fue 9. La presente investigación se realizará por Nonuplicado.

3.3. Hipótesis

El colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) a una concentración de extracto de 10 mg/mL tiene efecto bactericida *in vitro* sobre *S. mutans* y *E. faecalis*.

3.4. Operacionalización

VARIABLE	DIMENSIÓN	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES FINALES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	TÉCNICA	INSTRUMENTO
Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>.	Halos de inhibición (método de difusión en disco)	Sustancia química sintetizada parcial o totalmente en laboratorio capaz de inhibir el crecimiento y/o destruir al <i>Streptococcus mutans</i> y a <i>Enterococcus faecalis</i>	Los halos de inhibición es el área de ausencia de crecimiento bacteriano formado alrededor del disco con antimicrobiano, se mide en mm.	Halo de 15-25 mm Efecto bacteriostático. Halo > 25 mm Efecto bactericida	mm (milímetros)	Cuantitativa	De Razón	Método de difusión en disco	Vernier milimétrico
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	No Aplica	Forma de crecimiento bacteriano en un medio líquido, propio de una bacteria anaeróbica o	Un botón de crecimiento es el cúmulo de UFC depositadas en el fondo del pocillo de la	Botón < a 2000 μ m de diámetro = Inhibición	μ m (micrómetros)	Cuantitativa	De razón	Método de microdilución	Software Leica LAS EZ y lámina micrométrica

		anaerobia facultativa.	placa de microdilución observables macroscópicamente						
Concentración Mínima Bactericida (CMB)	No Aplica	Forma de crecimiento bacteriano en un medio líquido, propio de una bacteria anaeróbica o anaerobia facultativa.	Concentración o cantidad mínima del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de romero, que mata a las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .	Crecimiento bacteriano: UFC 99.9% = inactivo 0.1% = sobrevivieron	Unidad Formadora de Colonias UFC	Cuantitativa	De razón	Método de microdilución	Software Leica LAS EZ y lámina micrométrica

3.5. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.5.1. Obtención de la planta de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

La planta de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) fue adquirida en la sección plantas medicinales del mercado Modelo. Las hojas y flores fueron transportadas al *Herbarium Truxillense* de la Universidad Nacional de Trujillo para su correcta identificación.

3.5.2. Obtención del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

3.5.2.1. Preparación de la hoja de la planta de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) material vegetal.

Las hojas de la planta *Rosmarinus officinalis* fueron lavadas y luego secadas en horno a 50° C durante 24 horas después de las cuales dicho material fue colectado en un recipiente para la molienda.

3.5.2.1.1. Molienda de la hoja de la planta de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

El material seco de *Rosmarinus officinalis* fue molido en un molino artesanal desinfectado previamente con alcohol al 70%. Posteriormente el material molido fue pesado en balanza analítica.

3.5.2.1.2. Maceración etanólica del material vegetal molido y obtención del extracto seco.

En un recipiente de vidrio de color ambar de capacidad de 1000 mL se colocó 100 g del material seco de *Rosmarinus*

officinalis, y se le incorporó 900 mL de Etanol absoluto. El sistema preparado fue colocado en un agitador magnético durante siete días. Después de los siete días el macerado fue filtrado a través de papel de filtro N° 40, N° 1 y N° 2 después de lo cual quedó listo para ser utilizado.

3.5.3. Determinación de la CMI del colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) mediante el método de microdilución.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizó el método de microdilución que consistió en la utilización de una microplaca de 96 pocillos (ANEXO 1). En la serie horizontal de 12 pocillos se incorporó a los diez primeros las concentraciones del colutorio con cada concentración de extracto a evaluar (de 1mg/ml hasta 10 mg/mL). Los pocillos 11 y 12 fueron utilizados para el control positivo (Gluconato de clorhexidina) y control negativo (solo suspensión bacteriana). Se incorporó a cada pocillo 100 μ L del inóculo bacteriano estandarizado y 100 μ L del colutorio con la concentración del extracto a evaluar. Los 8 pocillos verticales de la microplaca constituyeron duplicados de cada ensayo. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas en anaerobiosis después de las cuales se realizó la lectura de resultados. Se consideró como CMI aquel pocillo de la microplaca donde no se observó crecimiento bacteriano (no hubo formación de botón ni turbidez) o el diámetro del botón fue menor a 2000 μ m.¹⁴

3.5.4. Determinación de la CMB del colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) mediante el método recuento de UFC en placa.

La concentración mínima bactericida (CMB) se realizó por el método de siembra en superficie para el recuento de UFC a partir de la microplaca donde se determinó la CMI. Para lo cual se sembró con una micropipeta 100 µL de solución del pocillo donde no se observó crecimiento (CMI) y los pocillos siguientes en placas con agar Mueller Hinton. La siembra de la muestra se realizó en superficie por dispersión con asa de Drigalsky. Los resultados se expresaron en UFC/placa. En aquella placa donde el crecimiento bacteriano sea menor a una unidad formadora de colonia será considerada la concentración mínima bactericida.¹⁴

3.5.5. Elaboración del colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

Teniendo en cuenta la CMB del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) se procedió a formular el colutorio. Dentro de la fórmula se consideraron las materias primas más importantes:

un tensioactivo o detergente (Lauril éter sulfato de sodio), sustancias humectantes (sorbitol y glicerina), un saborizante (sabor menta), un edulcorante (sacarina sódica) y el extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero). Las concentraciones utilizadas de cada materia prima estuvieron dentro de los rangos sugeridos por la bibliografía. Se elaborará una formulación.

En la Tabla 2 se presenta la fórmula unitaria para una

presentación de 80 ml.³⁵

Tabla 2. Fórmula Unitaria Colutorio A

Sustancia	Porcentaje	Cantidad
Emal 70 (Lauril éter sulfato de sodio)	3,75%	3 g
Glicerina	18,38%	14,7 g
Sorbitol	5,63%	4,5 g
Sacarina sódica	0,04%	0,032 g
Extracto alcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i>	10 mg/mL	10 ml
Agua	33,88%	c.s.p.80 ml
Total	100%	

Fuente: Mosquera Tatiana et al. (2011).^{13, 35, 42,}

3.5.6. Obtención de las cepas de *Streptococcus mutans* y

Enterococcus faecalis.

Las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo, fueron reactivadas en caldo Mueller Hinton (según Merck) 18 horas antes de la experimentación.

3.5.7. Preparación y estandarización de los inóculos

Se realizó siguiendo el método descrito por Al – Delaimy, en 1970 que utiliza la técnica turbidimétrica, con la cual determinamos la concentración inicial de la bacteria, en el tubo número 0,5 (1,5 x10⁸ufc/mL) del nefelómetro de MacFarland. La turbidez adecuada fue verificada usando un espectrofotómetro marca UNICO UV-VISIBLE modelo S1200, la absorbancia a 625 nm deberá encontrarse entre 0,08 – 0,10 que es lo recomendado. El inóculo

preparado fue utilizado dentro de los 15 minutos siguientes como recomienda el método.

3.5.8. Determinación de la sensibilidad antibacteriana de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* a un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* mediante el método de Difusión en disco.

El inóculo estandarizado de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* (Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado) fueron inoculados independientemente sobre placas de Agar Mueller Hinton con ayuda de un hisopo estéril, luego se dejaron secar durante 15 minutos en estufa a 37 °C.

Posteriormente se colocó en la superficie de las placas inoculadas discos de papel de filtro estéril impregnados en las concentraciones de 1 a 10 mg/mL del colutorio a razón de 3 discos por placa. Las placas fueron colocadas en incubación a 36.5°C durante 18 a 24 horas después de las cuales se realizó la lectura correspondiente.

3.6. Procedimiento para la recolección de datos

3.6.1. Método de difusión en agar

Se procederá a medir los halos de inhibición bacteriana de los discos con la concentración del colutorio evaluado. Dichos datos serán colocados en tablas, que luego serán comparadas con los halos obtenidos en el control positivo (gluconato de clorhexidina al 0,12%).

3.7. Análisis Estadístico e Interpretación de los datos

La interpretación de los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos, se midieron y compararon los diámetros de los halos de inhibición para cada concentración de los extractos evaluados. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos. Para el objetivo general, Se aplicó también la prueba de comparaciones múltiples HSD de Duncan entre los controles y los ensayos problema, a fin de evaluar las diferencias significativas que puedan existir en relación al promedio del diámetro de inhibición. El análisis se realizó con Software SPSS V20.

3.8. Criterios éticos

Se reportó la veracidad de los resultados obtenidos.

Los cultivos bacterianos utilizados en la presente investigación fueron autoclavados (método de eliminación microbiana) antes de su eliminación, a fin de salvaguardar la seguridad de todas las personas que entren en contacto con dichos residuos.

3.9. Criterios de rigor científico

La metodología empleada es validada a nivel internacional por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) cuyos procedimientos, metodologías, aseguran la calidad y fidelidad de los resultados. La presente investigación cumple con todos los criterios de rigor científico, siendo por tanto una investigación inédita y original.

IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Resultados en tablas y gráficos

El estudio experimental realizado sobre el efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio a base de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* determinado mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición, evidenció un promedio de halo de 35 mm para *S. mutans* y de 30 mm para *E. faecalis* correspondientes a la concentración de 10%. Se trabajó con dos controles, el control positivo constituido por Gluconato de clorhexidina al 0,12% y el control negativo por alcohol etílico (solvente de extracción del extracto).

Se realizó un análisis de varianza a los promedios de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos, y los resultados permitieron determinar la existencia de efecto antibacteriano del colutorio a base de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Streptococcus mutans* y

Enterococcus faecalis.

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que el *Streptococcus mutans* fue más sensible al colutorio elaborado con extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) en comparación a *Enterococcus faecalis*, pues se observaron mayores halos de inhibición para el primero. En el gráfico 1, la línea de color azul representa los halos de inhibición obtenidos por *Streptococcus mutans* y la línea de color rojo obtenidos por *Enterococcus faecalis*, para el ensayo control positivo (gluconato de clorhexidina al 0,12%) y ensayo problema (colutorio a base de romero).

En la tabla 2 y 3 se representa el análisis de varianza (ANOVA) de los halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*. En la tabla 2 se determinan que a mayor concentración del colutorio con extracto de *Rosmarinus officinalis* menor es el botón de crecimiento de *Streptococcus mutans*. Así mismo el colutorio con la concentración de 2 mg/mL de extracto constituyó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración del colutorio con 5 mg/ml constituyó la concentración mínima bactericida (CMB).

En la tabla 3 se determina que a mayor concentración del colutorio con extracto de *Rosmarinus officinalis* menor es el botón de crecimiento de *Enterococcus faecalis*. Así mismo el colutorio con la concentración de 3 mg/mL. de extracto constituyó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración del colutorio con 6 mg/ml constituyó la concentración mínima bactericida (CMB).

Tabla 1. Efecto antibacteriano *in vitro* de un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero).

Concentració	Susceptibilidad bacteriana							
	<i>Streptococcus mutans</i>				<i>Enterococcus faecalis</i>			
	Medi a (mm)	DE	Varianz a	Valo r de p	Medi a (mm)	DE	Varianz a	Valo r de p
10 mg/mL	35	3.32	11.0		30	0.71	0.5	
		a		0.00		a		

Control +	17.8	1.48	2.2 b	12.6	0.89 b	0.8	0.00	n
------------------	------	------	-------	------	-----------	-----	------	----------

Análisis de varianza; Prueba: Duncan; DE: desviación estándar; a, b: letras diferentes indican diferencias con el control. Control +: Gluconato de clorhexidina 0,12%.^{13, 41}

Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Duncan de los diámetros de halos de inhibición en milímetros de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* frente a un colutorio elaborado a base de extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%).^{13, 41}

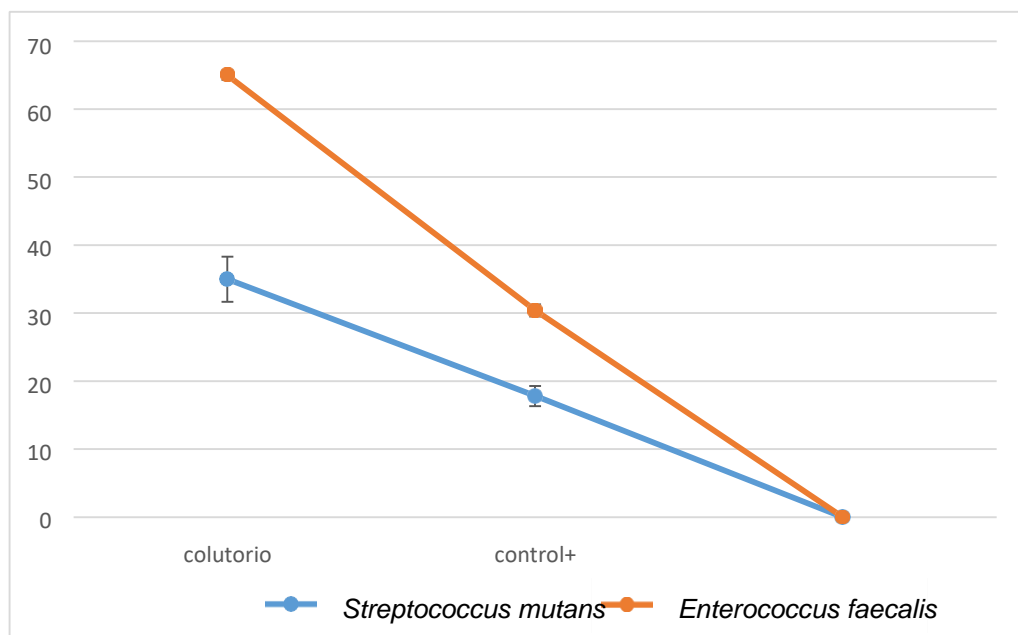
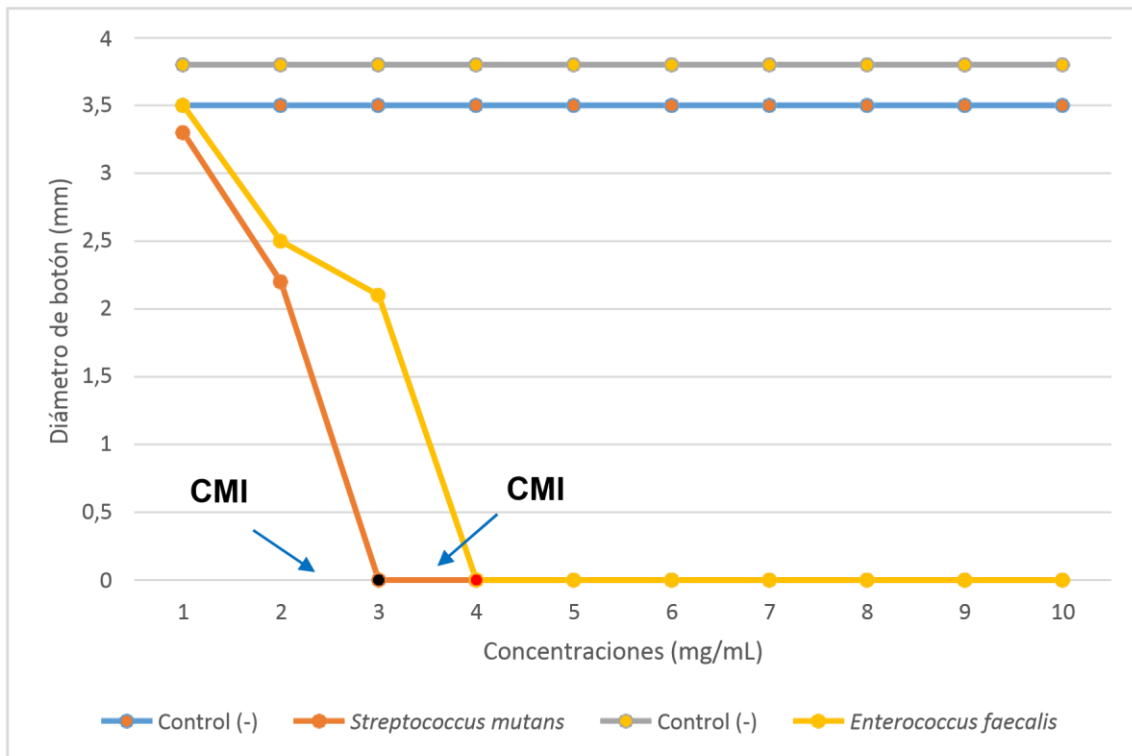


Gráfico 1. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros, de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* frente a un colutorio elaborado a base de extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%).^{13, 41}

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de microdilución.

Concentración n mg/mL	Diámetro de Botón en mm			
	Control (-)	<i>Streptococcus mutans</i>	Control (-)	<i>Enterococcus faecalis</i>
1	3.5	3.3	3.8	3.5
2	3.5	2.2	3.8	2.5
3	3.5	0	3.8	2.1

4	3.5	0	3.8	0
5	3.5	0	3.8	0
6	3.5	0	3.8	0
7	3.5	0	3.8	0
8	3.5	0	3.8	0
9	3.5	0	3.8	0
10	3.5	0	3.8	0



Fuente: Análisis de datos (Elaboración propia).

● = CMI frente a *Streptococcus mutans*

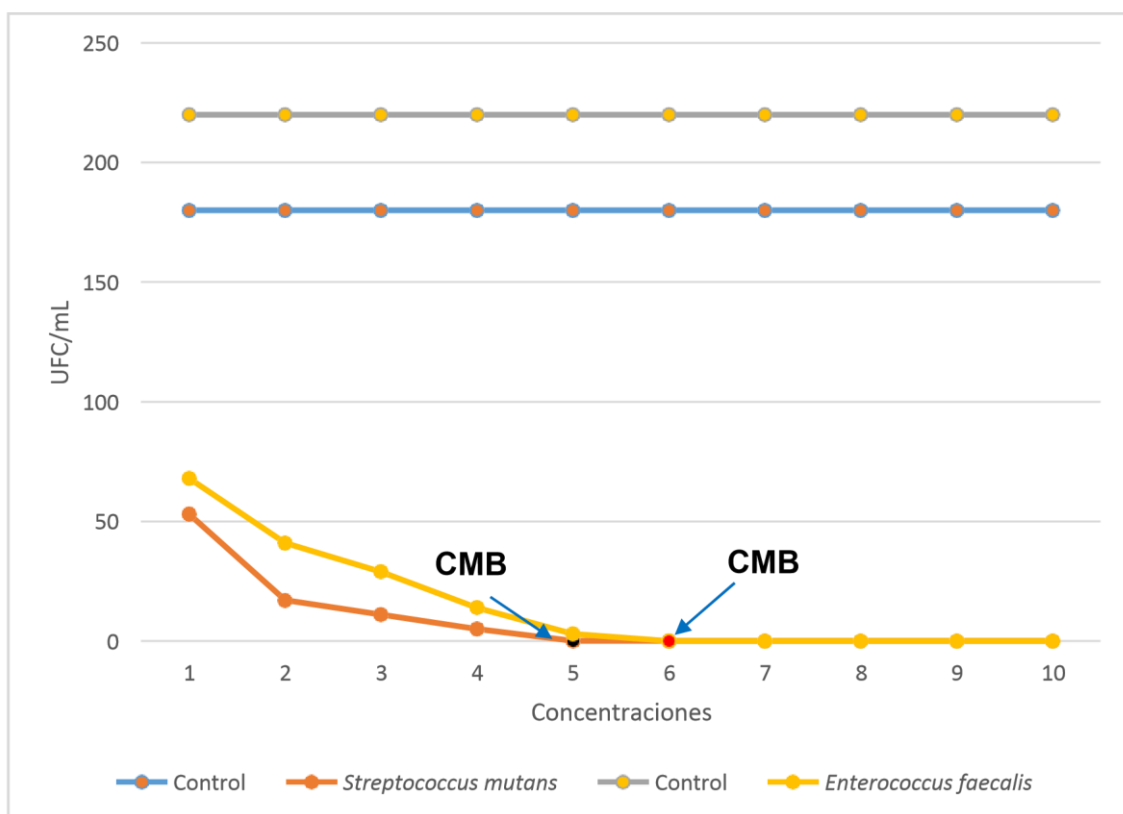
● = CMI frente a *Enterococcus faecalis*

Gráfico 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de microdilución.

Tabla 3. Concentración mínima bactericida (CMB) de un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de recuento de UFC en placa.

Concentración n mg/mL	Unidades formadoras de colonias (UFC/placa)	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
0	180	220

1	53	68
2	17	41
3	11	29
4	5	14
5	0	3
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0



Fuente: Análisis de datos (Elaboración propia).

● = CMB frente a *Streptococcus mutans*

● = CMB frente a *Enterococcus faecalis*

Gráfico 3. Concentración Mínima Bactericida (CMB) de un colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de recuento de UFC en placa.

4.2. Discusión de resultados

De todos los microorganismos involucrados en el desarrollo de caries dental se reconoce al *Streptococcus mutans* como la bacteria más preponderante e importante en la iniciación y desarrollo de la caries convirtiéndolo en un problema de salud pública mundial. Esto ha obligado a las instituciones de salud de todos los países a diseñar medidas de prevención dirigidas hacia el control de ésta bacteria en la cavidad oral. Este control principalmente se concentra en la utilización de antimicrobianos y antisépticos, principalmente de uso tópico o local que se vienen utilizando conjuntamente con las técnicas de cepillado para lograr su control mediante la eliminación de la placa bacteriana.

Por otra parte, *Enterococcus faecalis* tiene una característica notable que lo constituye en un microorganismo de interés estomatológico y es su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de Cloruro de Sodio), temperaturas extremas (15-60°C) y puede resistir además a la acción de colorantes como Azul de Metileno al 0,1%. Esta capacidad de resistencia por parte de *E. faecalis* en microambientes tóxicos está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento endodóntico y en los cuales los nutrientes son limitados, añadiéndose a esta situación el hecho de que algunos agentes antimicrobianos pudieran influir en que esta especie permanezca en los conductos de los dientes afectados.⁴⁰

La utilización de plantas consideradas medicinales debido a los principios activos que concentran está siendo cada vez más aceptada

en todas las sociedades alcanzando un auge inesperado. Teniendo en cuenta que nuestros antepasados usaban vegetales para curar múltiples enfermedades o problemas de salud en general. La información científica sobre la utilidad de las plantas medicinales hoy en día es muy numerosa, y el creciente número de plantas conocidas e investigadas hace que el profesional de la salud se vea cada vez más obligado a tener un conocimiento serio y objetivo sobre la utilidad real de las plantas a fin de proponer alternativas de solución que contribuyan al control de los agentes bacterianos causantes de enfermedades de interés estomatológico.

Existen muchas investigaciones en el cual se hace uso de los extractos de origen vegetal e incluso en algunas estudios ya se vienen incorporando en materiales o productos de higiene oral así como en enjuagues bucales. Algunas plantas que se vienen incorporando a estos productos son *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Aloe vera* (sábila), entre otras. Pero no existen trabajos semejantes en los cuales se haya utilizado el extracto de romero como constituyente esencial de la formulación de un colutorio como es el caso de la presente

investigación por lo cual esto la constituye en una investigación inédita. En la presente investigación se buscó determinar si el colutorio a base de extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) ejercía efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* lo cual quedó demostrado, al comprobar el efecto de inhibición del desarrollo bacteriano con el colutorio estudiado, debido a la formación de halos de inhibición del crecimiento superiores al control

positivo que fue Gluconato de clorhexidina al 0,12%. Se encontraron diferencias significativas con respecto al promedio de los halos de inhibición de los diferentes ensayos evaluados.

Teniendo en cuenta que el componente bioactivo del colutorio elaborado fue extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y a partir de él se obtuvieron halos de inhibición superiores a los 30 milímetros los cuales superaron al control positivo que fue gluconato de clorhexidina al 0,12% (20 mm), determinándose que hubo efecto bactericida. Estos resultados se relacionan con el estudio de Brito M., et al. (2012)¹³ quien determinó la actividad antibacteriana del extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y su potencial para la desinfección de los conos de gutapercha, obteniendo como resultado que el extracto de la planta produjo zonas de inhibición comparables a los de los antibióticos probados. El extracto de *Rosmarinus officinalis* mostró un efecto bactericida sobre *Enterococcus faecalis* y la capacidad para desinfectar conos de gutapercha contaminados con la misma.

Por otro lado, como se puede apreciar en la presente investigación se trabajó con un extracto alcohólico de *R. officinalis* L. (romero) y bibliográficamente está documentado que la extracción de principios activos es mayor cuando se usa ese solvente como solución de extracción. A diferencia de Solano X. (2016)⁴, quien realizó un estudio para saber si existe inhibición de crecimiento bacteriano *in vitro* de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos: acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero), afirmó que, de acuerdo a los resultados, el extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93 mm

de halos de inhibición, mientras que los extractos acuosos no produjeron halos de inhibición. Por ello los promedios de los halos de que obtuvo fue (12 mm), a diferencia con mis resultados, los cuales fueron mayores (35 mm).

Los resultados de la investigación realizada contrastan con los obtenidos por Estévez H. (2016)¹⁵, quién pretendió comprobar la efectividad inhibitoria de los extractos de tomillo y romero (al 10%) frente al *Streptococcus mutans*, principal agente causante de caries dental. Concluyeron que ninguno de los extractos de las mencionadas plantas, al menos al 10%. Tal vez la diferencia en los resultados pueda deberse a que trabajar con concentraciones porcentuales es completamente diferente a las concentraciones volumétricas en las cuales si puede controlar la cantidad de compuestos bioactivos presentes. Además hay que considerar que por más que se trabaje con la misma especie vegetal los resultados pueden ser totalmente diferentes porque se ha demostrado que la concentración de principios activos presentes en un vegetal están relacionados directamente con el habitat donde se cultiva la misma, el tipo de suelo entre otros factores. En la presente investigación se pudo demostrar que el colutorio elaborado con una concentración de 10 mg/ml de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Dichos resultados fueron comprobados mediante la observación directa y a través del análisis estadístico que determinó diferencia significativa en los

promedios de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos controles y los ensayos experimentales.

Los resultados obtenidos en esta investigación revelan que *Rosmarinus officinalis* L. (romero) solo son aplicables en estudios *in vitro*, si se desea demostrar su relevancia clínica tendría que replicarse en estudios *in vivo* en línea celular como primera fase y posteriormente en animales de experimentación y luego en sujetos humanos o en sistemas donde las condiciones puedan ser las más parecidas a la cavidad oral. La secuencia del mismo dependerá del uso racional que se dé a estos resultados, tomando como referencia para elaboración de un nuevo colutorio o enjuague, dentífrico, o uso clínico como bacteriostático en la cavidad cariosa, destacando así su uso auxiliar a los métodos ya determinados, especialmente los mecánicos como el cepillado dental, sin pretender reemplazar alguno de ellos.

Por lo expuesto, el presente estudio sirve como base para que posteriormente se continúe ampliando los conocimientos sobre el empleo de este vegetal en la prevención y tratamiento de ciertas patologías de la cavidad oral. En tal sentido el colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* sugiere ser de importante uso como un complemento en el control de ciertos patógenos orales.

V. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación ha originado otras ideas de estudio que, las presentamos a continuación como propuestas de investigación:

1. Determinar el grado de toxicidad del extracto de *Rosmarinus officinalis* L. a fin de proponer estudios *in vivo*.
2. Realizar la cromatografía del extracto de *Rosmarinus officinalis* L. a fin de determinar los principios activos con actividad antibacteriana.
3. Evaluar colutorios con otros extractos vegetales con capacidad antibacteriana a fin de tener más alternativas de productos orales.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

1. El colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.
2. El colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* superando al control positivo Gluconato de clorhexidina al 0,12%.
3. El colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Enterococcus faecalis* superando al control positivo Gluconato de clorhexidina al 0,12%.
4. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* de 2 mg/mL y sobre *Enterococcus faecalis* fue de 5 mg/mL.
5. La concentración mínima bactericida (CMB) del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* de 3 mg/mL y sobre *Enterococcus faecalis* fue de 6 mg/mL.

6.2. Recomendaciones

1. Se recomienda que si se desea replicar la presente investigación tener en cuenta el origen de la planta evaluada pues es de

conocimiento común que los principios activos presentes en los vegetales pueden variar en concentración y tipo según el área geográfica en la cual se cultivan.

2. Se sugiere replicar la investigación utilizando tanto bacterias aisladas e identificadas fenotípicamente y genéticamente así como cepas certificadas.
3. Se recomienda utilizar los resultados de la presente investigación como antecedentes de investigación en el mismo campo o relacionados. Cómo es la elaboración de colutorios y/o enjuagues bucales con extractos vegetales.

REFERENCIAS

1. Negroni M. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica. 2a ed. Buenos Aires: Panamericana; 2009.
2. Liébana U. Microbiología Oral. 2a ed. Madrid: Interamericana; 2002.
3. Castañeda J. Estudio de susceptibilidad in vitro de *Enterococcus* spp. Revchilinfecol.19: 111 – 115; 2002.
4. Solano X. Inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de romero (*Rosmarinus officinalis*), aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco [Licenciatura]. Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.
5. Centurión K. Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpiniaspinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Licenciatura]. Universidad Privada Antenor Orrego; 2015.

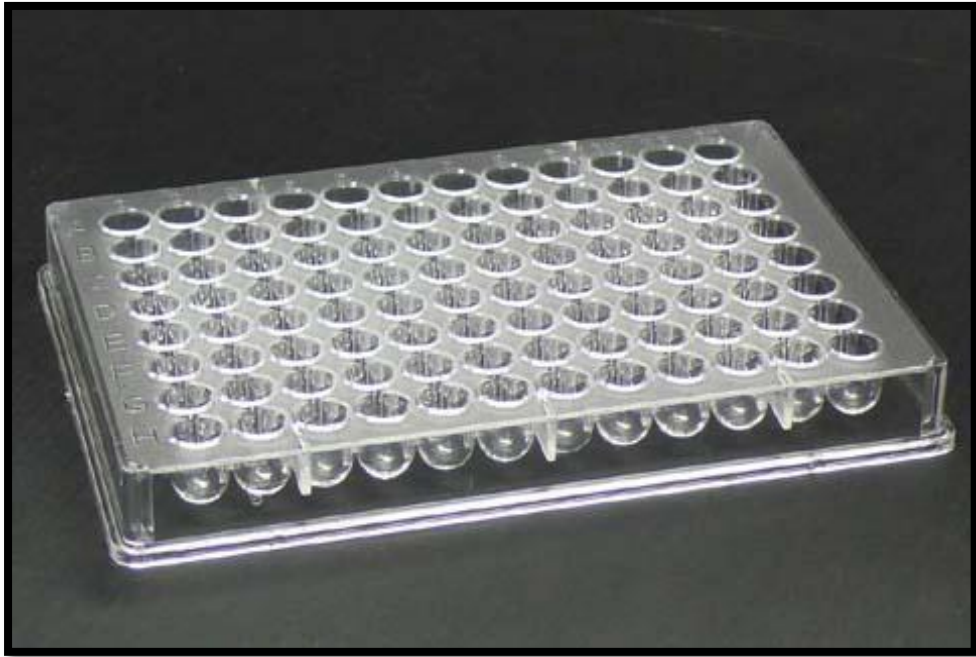
6. Brooks, G., Batel, J., & M., et al. Microbiología Médica de Jawest, Meldick y Adelberg. 16^a ed. México: El Manual Moderno; 1999.
7. Domingo, D., y Lopez-Brea, M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. EspQuimioterap. 16(4):385-393; 2003.
8. Hernández A. Glosario de agentes biológicos; 2008.
9. Stefanello A., Gonzáles P., et al. Caries Dental. *Odontología Restauradora y Estética*. Sao Paulo: Amolca; 2005.
10. Buzzini P, Martini A. Discrimination between *Candida albicans* and Other Pathogenic Species of the Genus *Candida* by Their Differential Sensitivities to Toxins of a Panel of Killer Yeasts. J. Clin. Microbiol. 39: 3362 – 3364; 2001.
11. Cowan. M. Plants Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4): 564-82; 1999.
12. Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: Test de difusión por discos y test por dilución. Ministerio de Salud; 2001.
13. Brito M., Nobre S., et al. Antibacterial Activity of a plant extract and its potential for disinfecting Gutta - Percha Cones. Acta Odontológica Latinoamericana. Vol. 25(1): 9-13. ISSN 0326-4815; 2012.
14. Ramírez L., Marín D. Metodologías para evaluar in Vitro la Actividad Antibacteriana de Compuestos de Origen Vegetal. Scientia et Technica. 42:263-268, 2009.
15. Héctor E. Efectividad de inhibición del extracto de tomillo y de romero (al 10%) frente al *Streptococcus mutans* en 20 muestras. [Licenciatura]. Quito Universidad Central del Ecuador; 2016.

16. Paola H. Efecto antimicrobiano de los extractos de las hojas de tomillo (*Thymus vulgaris*) y de las pepas de ajo (*Allium sativum*) sobre las cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *in vitro*. [Licenciatura]. Quito Universidad Central del Ecuador; 2016.
17. Muñoz, L. Plantas medicinales españolas, *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero). *Stud. bot*, 105-118; 2002.
18. Gónzales Michel, A. *Guía técnica del cultivo de romero (Rosmarinus officinalis)*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2013.
19. De Sousa, Talita, M. P., & Monte Conceição, D. Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Ensaio e Ciência. Nursing*: 2007; 7-13.
20. Avila-Sosa R., Navarro A., et al. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 23-36; 2013.
21. Estrada O.S. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). [Doctorado]. Riobamba Escuela Superior Politécnica del Chimborazo; 2010.
22. Vivancos, V. Estudio de la Variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. en la región de Murcia. [Doctorado]. Murcia; 2014.
23. Ardila Q., Vargas A., Pérez C., et al. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*; (2009).
24. Eugenia Caryophyllata, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 47-57.

25. Rodríguez E., Árias A., et al. Rendimiento y Capacidad Antioxidante de Extractos de Rosmarinus Officinalis, Salvia Officinalis y PsidiumGuajavaOBtenidos con CO2 supercítico. *Acad*, XXXXVI(140), 306-315; 2012
26. Cowan, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *ClinicalMicrobiologyReview*, 564–582; 1999.
27. Domingo D., & López M. Plantas con acción antimicrobiana. *EspQuimioterap*, 16(4), 385-393; 2003.
28. ESCOP European Scientific Cooperative on Phytotherapy. Monographs on the medicinal uses of plant drugs. *ESCOP*, 3; 1997.
29. Genena A., Hense H., Smania J., et al. (Rosmarinus officinalis) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(2), 463-469; 2008.
30. Hentz S., Santin N. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (Rosmarinus officinalis L.) contra Salmonella sp. *Evidência, Joaçaba*, 7(2), 93-100; 2007.
31. Paulino de Sousa, T. M., & Monte Conceição, D. Atividade antibacteriana do alecrim (Rosmarinus officinalis L.). *Anhanguera Educacional Ltda*, 7-13; 2006
32. Araújo M., Silva R., Higino J., et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de Rosmarinus officinalis Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 236-240; 2008.

33. Wanderley Y., Almeida L., Nascimento W. Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. *OdontoCienc*, 26(2), 139-144; 2011.
34. 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 de pregrado).
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2013. Obtenido de CybertesisRepositorio de Tesis Digitales: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3093>.
35. Mosquera T., Vera T. Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. ex *O.C. Schmidt* y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry. *La Granja*. Vol. 13(1):31-41. ISSN: 1390-3799; 2011
36. Mimica-dukic N, Bozin B, Sokovic M, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med*. 69 (5): 413-419; 2003.
37. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, et al. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. *Ital J Food Sci.*; 13 (1): 65- 75; 2001.
38. Enlace noticial. Ministerio de Salud. Problema de Salud Mundial de Salud 2014. <http://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevención>.
39. Vera E., Blanqueadores, alto costo para la salud dental. *Universidad Nacional de Colombia*. Edición: Un Periódico Impreso No. 127; 2009.
40. Henostroza G., et al. Diagnóstico de caries dental. 1ª ed. Vol. 21, Lima: *Universidad Peruana Cayetano Heredia*, 2005.

41. Alvarado V., Moromi H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novo granatense*, *Plowmanvar Truxillense* y *Camelliasinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. *Odontología Sanmarquina*. 13(2):21-25, 2010.
42. Bamberger K., Callave S. Efecto de los extractos de las hojas de “chinininga” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* *in vitro*. Tesis Licenciada en Farmacia y Bioquímica. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2010.
43. Pérez J. Efecto Antibacteriano *in vitro* de *Eleutherine bulbosa* frente a *Escherichia coli* aislada de urocultivo. Tesis Bachiller en Medicina. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2016.
44. Vargas A. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tagetes minuta*, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus*. Tesis Biólogo-Microbiólogo. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2013.
45. Quevedo, E. Efecto antibacteriano de los extractos de *Hojas de Piper* sp. Frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* *in vitro*. Tesis Farmacia y Bioquímica. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2011.



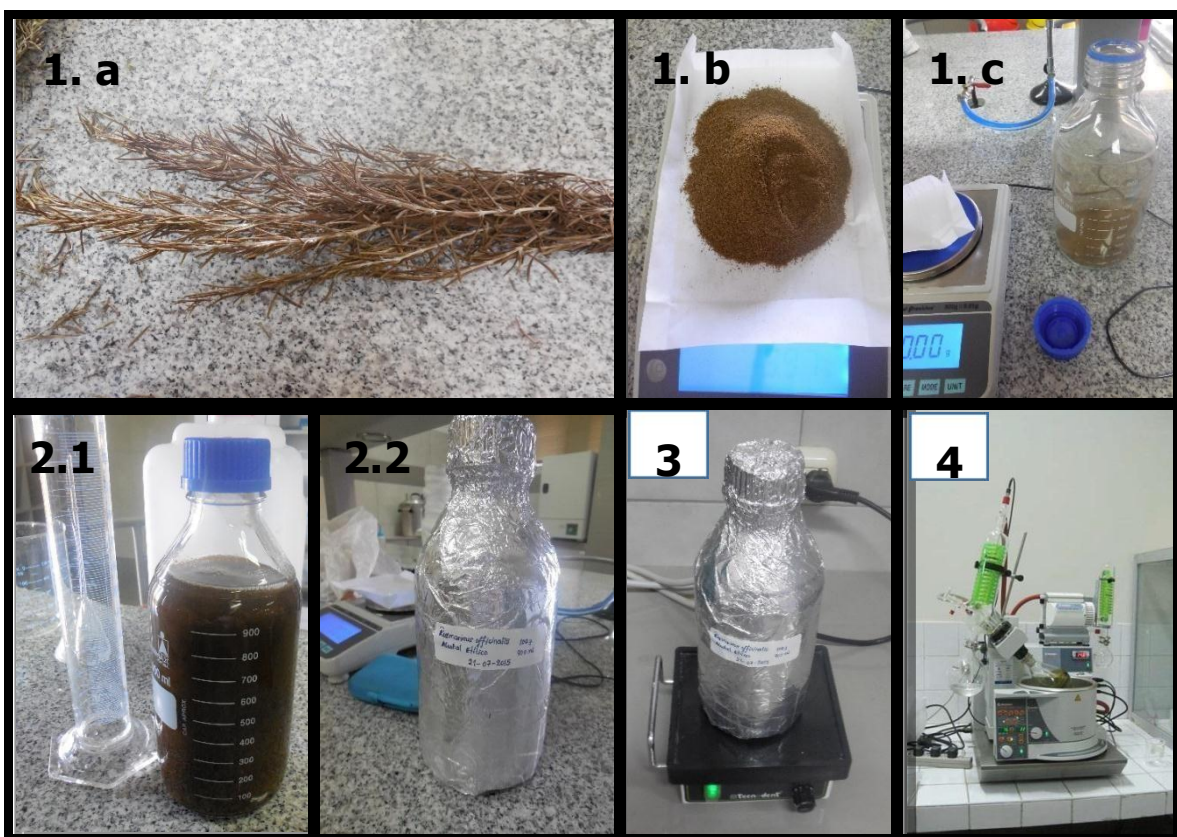
ANEXO 1. Microplaca



ANEXO 2. Espectrofotómetro

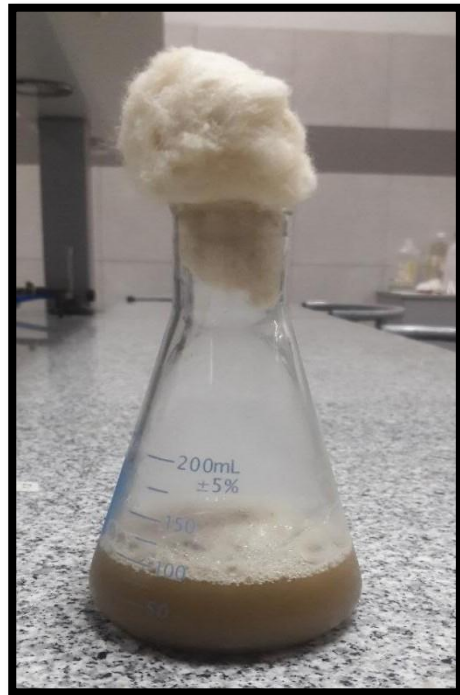
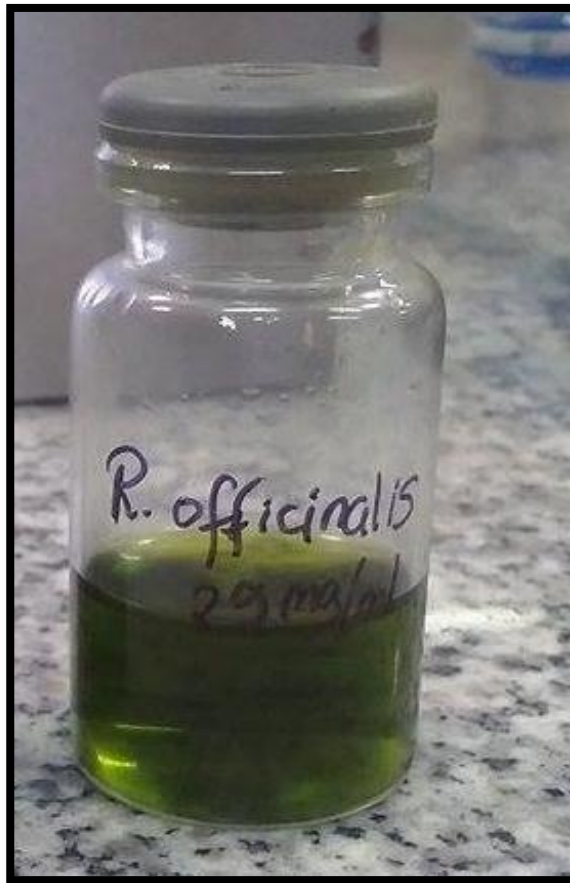


ANEXO 3. *Rosmarinus officinalis* (romero).

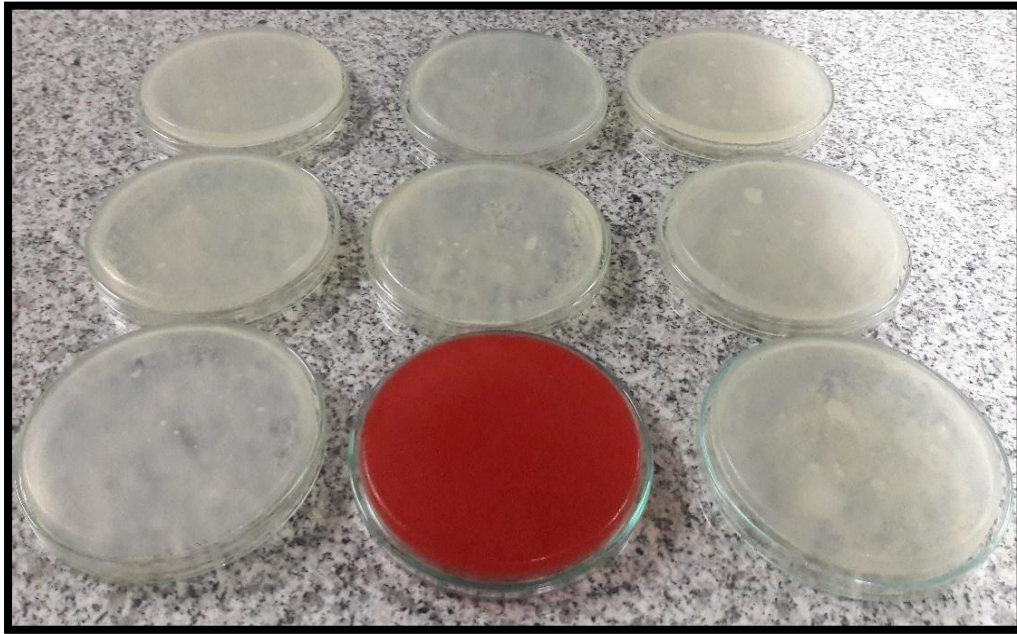


ANEXO 4. Proceso de obtención de extracto etanólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero).

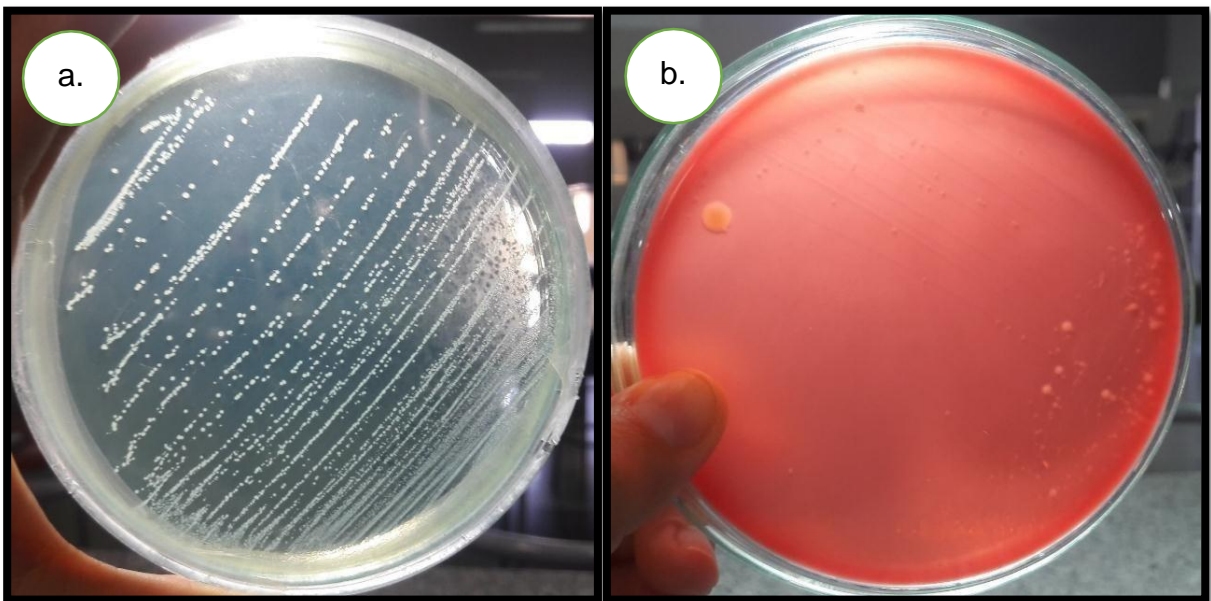
1. a. Secado, b. molienda y c. pesado de *Rosmarinus officinalis* “romero”.
2. Adición de etanol al polvo seco de las hojas forrado de botella con papel aluminio para proteger de la luz. 3. Maceración del polvo seco de hojas en agitación.
4. Secado del extracto etanólico en Rotavapor.



ANEXO 5. Extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

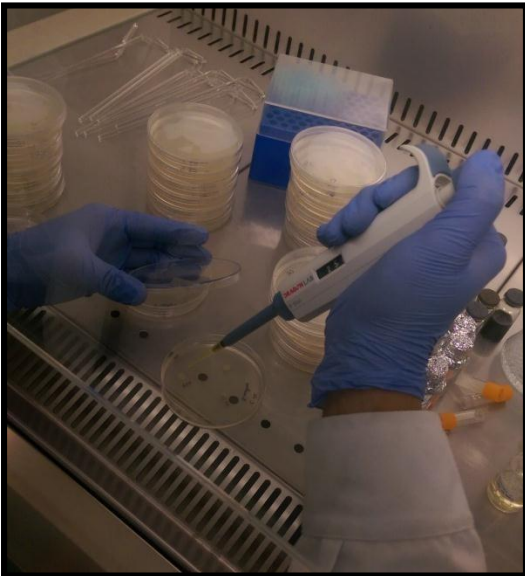
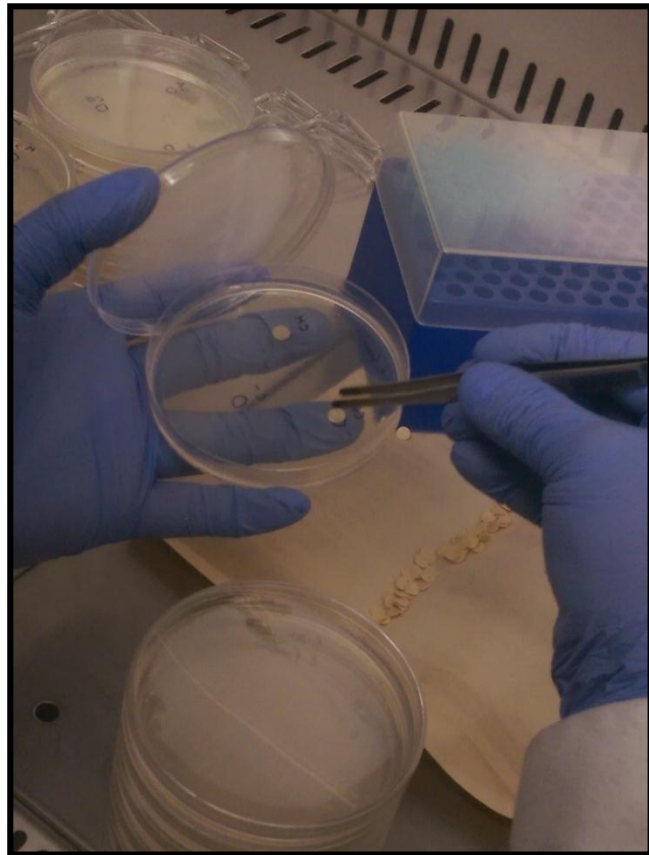
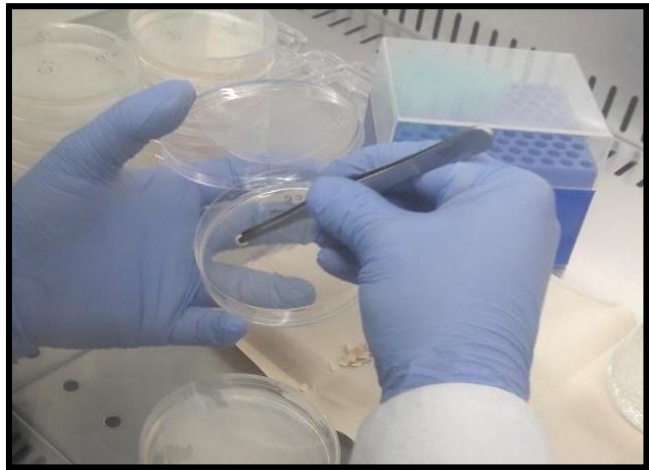


ANEXO 6.Elaboración del Colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

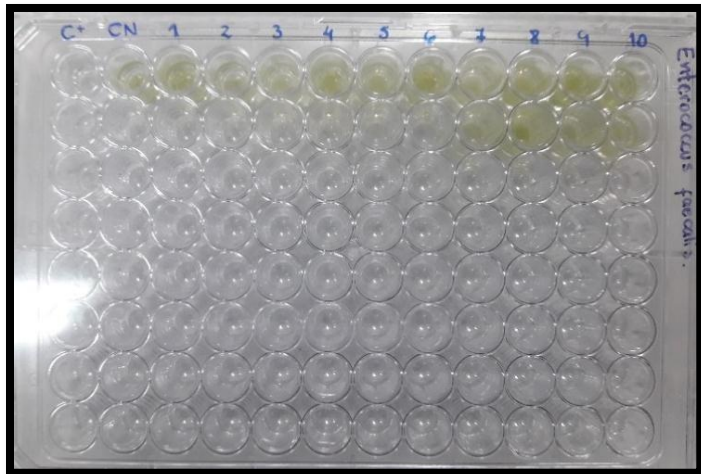
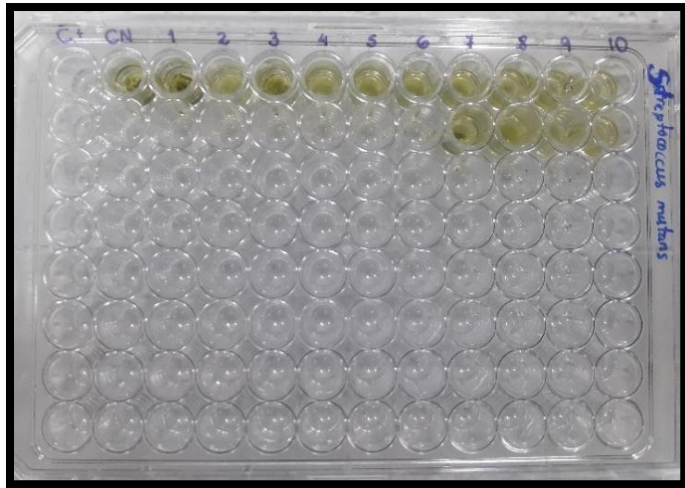
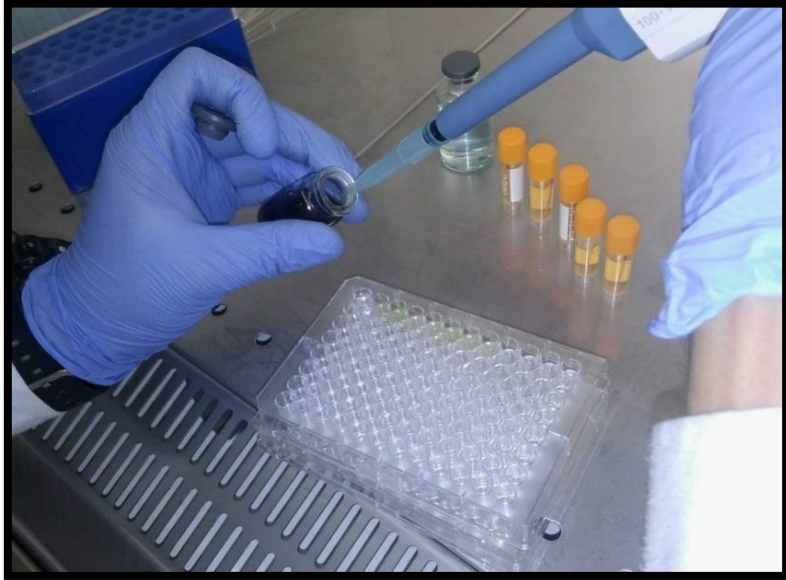


ANEXO 7. Proceso de reactivación de las cepas *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en placas.

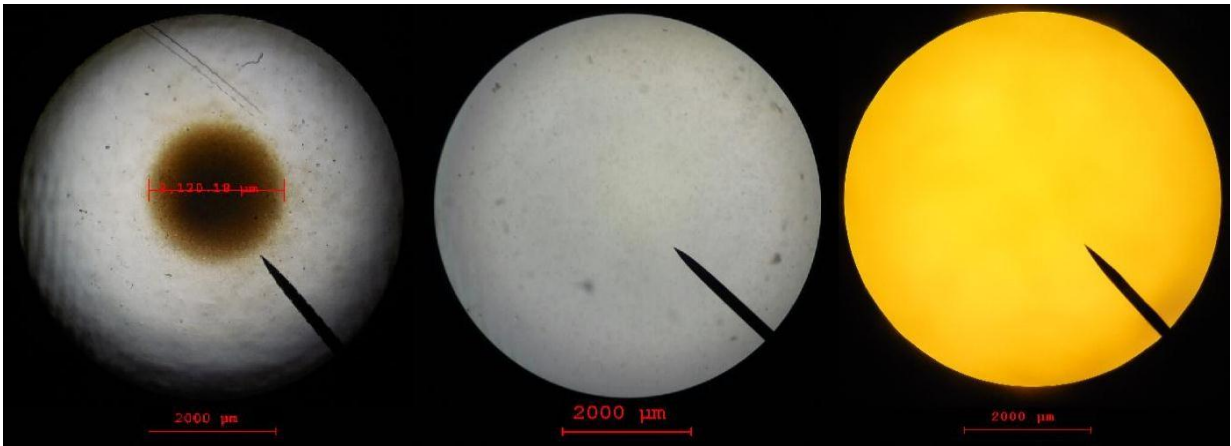
- a. Observación de *Streptococcus mutans*
- b. Observación de *Enterococcus faecalis*



ANEXO 8. Proceso de sembrado en placas colocación de discos y aplicación del extracto de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* e incubación de las placas.



Anexo 9. Proceso de inoculación en las microplacas.



Concentración

0 mg/mL

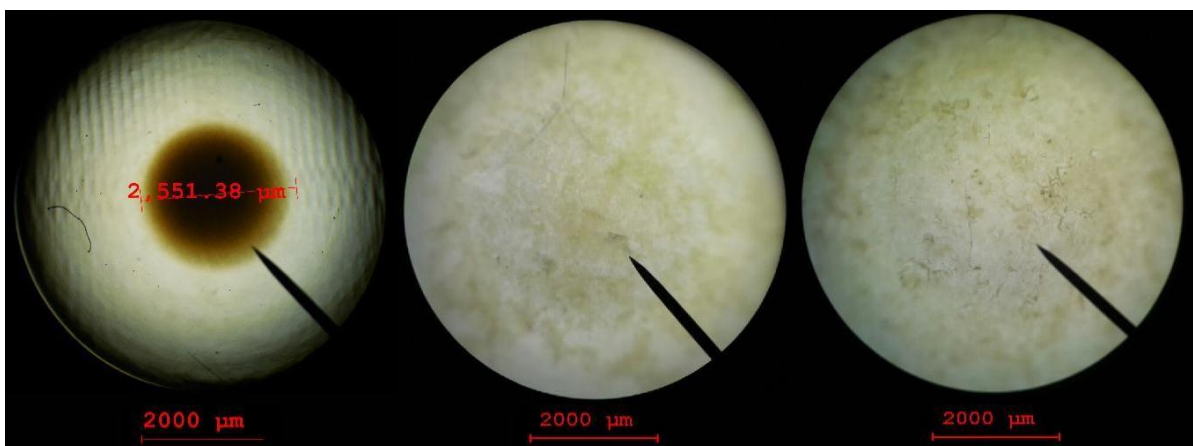
Concentración

2 mg/mL

Concentración

5 mg/mL

Anexo 10. Fotografía de la medición de los botones de crecimiento de *Streptococcus mutans* sometido a los colutorios elaborados con 10 concentraciones de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) mediante el software LAS EZ del microscopio con video cámara Leica DM500 ICC50HD.



Concentración

0 mg/mL

Concentración

3 mg/mL

Concentración

6 mg/mL

Anexo 11. Fotografía de la medición de los botones de crecimiento de *Enterococcus faecalis* sometido a los colutorios elaborados con 10 concentraciones de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) mediante el software LAS EZ del microscopio con video cámara Leica DM500 ICC50HD.

Anexo 12

: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* frente al colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) mediante el método de difusión en disco.

Ensayos Concentraciones (mg/mL)	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)			
	E1	E2	E3	Promedio
Control (+)	17.5	18.1	17.9	17.8
Colutorio	35.4	34.9	35	35.1

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

E1, E2 y E3 = constituyen duplicados del ensayo

Control (+)= Control positivo (Gluconato de Clorhexidina)

Anexo 13

87 : Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de *Enterococcus faecalis* frente al colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) mediante el método de difusión en disco.

Ensayos Concentraciones (mg/mL)	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)			
	E1	E2	E3	Promedio
Control (+)	12.5	12.4	12.8	12.6
Colutorio	29.8	30.3	30.2	30.1

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

E1, E2 y E3 = constituyen duplicados del ensayo

Control (+) = Control positivo (Gluconato de Clorhexidina)

Anexo 14

88

: Promedio de los diámetros de botón de crecimiento de *Streptococcus mutans* del colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a 10 concentraciones mediante el método de microdilución.

Ensayos Concentraciones (mg/mL)	Diámetro de botón (mm)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	Promedio
Control (-)	3.65	3.40	3.45	3.52	3.43	3.52	3.52	3.51	3.50
1	3.39	3.38	3.29	3.48	3.31	2.95	3.42	3.35	3.32
2	2.21	1.98	2.25	2.4	2.22	1.95	2.1	2.5	2.20
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

E1, E2...E8 = constituyen duplicados del ensayo

Control (-)= Control negativo, solo crecimiento bacteriano.

Anexo 15

89

: Promedio de los diámetros de botón de crecimiento de *Enterococcus faecalis* del colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a 10 concentraciones mediante el método de microdilución.

Ensayos Concentraciones (mg/mL)	Diámetro de botón (mm)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	Promedio
Control (-)	3.65	3.61	3.95	3.65	4.22	3.52	3.83	3.75	3.80
1	3.50	3.45	3.4	3.48	3.45	3.75	3.42	3.52	2.50
2	2.11	2.10	2.25	2.2	2.11	2.00	2.10	2.00	2.10
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

E1, E2...E8 = constituyen duplicados del ensayo

Anexo 16

Control (-)= Control negativo, solo crecimiento bacteriano



HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)
Universidad Nacional de Trujillo



[Handwritten signature]
 Dr. José Mostacero León



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)
FLORA PERUANA



Familia: Lamiaceae
 Nombre científico: *Rosmarinus officinalis* L.
 N. vulgar: romero Det. por: Dr. José Mostacero L.
 Hábito: Planta erguida, tallos lignificados con hojas firmes, estrechas y agudas. Flores de color azul con estambres más largos que los pétalos. Fruto seco con semillas menudas.
 Procedencia: Biohuerto Facultad de CC.BB. - UNT
 Provincia: Trujillo Departamento: La Libertad
 Habitat: laderas y collados
 Altitud: Hasta 1.500 m.s.n.m. Fecha: 19 de Agosto 2016
 Leg: Madeleine Loja Montoya No. 0009



USS



UNIVERSIDAD
SEÑOR DE SIPÁN

**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA ACADÉMICO
PROFESIONAL DE ES TOMATOLOGÍA**

DECLARACIÓN JURADA DE DESARROLLO DE TESIS

Yo, **Miguel Angel Ruiz Barrueto**, identificado con DNI 42814146 y CBP: 8256, Biólogo Microbiólogo de Profesión, declaro bajo juramento haber desarrollado la ejecución de la tesis titulada: **EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE UN COLUTORIO ELABORADO CON EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* L. (romero) SOBRE *Streptococcus mutans* Y *Enterococcus faecalis*** en lo que respecta a la metodología microbiológica de la investigación con apoyo del Tesista **Loja Montoya Madeleine**, autor de la tesis mencionada. La metodología utilizada en esta investigación es validada internacionalmente por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) que es la institución que norma y reglamenta los protocolos para la evaluación de agentes antimicrobianos como es el que se evaluó en la presente tesis. Se realizaron duplicados y repeticiones de los ensayos con lo cual se aseguró la fiabilidad de los resultados.

Firmo, sello y coloco mi huella digital en el presente documento en señal de conformidad.

Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto

DNI: 42814146

CBP: 8256

