FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Escuela Profesional De Estomatología

TESIS

EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Rosmarinus Officinalis* (ROMERO) Y DEL *AGUA OZONIZADA* SOBRE *Streptococcus mutans* Y *Enterococcus faecalis*

Para optar el título profesional de:

Cirujano Dentista

Autor:

Bach. Sosa Flores Josué André

ASESOR METODOLOGICO:

Mg. Córdova Salinas Imer Duverli

ASESOR ESPECIALISTA

M. Sc. Ruiz Barrueto Miguel Angel

Pimentel – Perú

2015

EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO) Y DEL *AGUA OZONIZADA* SOBRE *Streptococcus mutans* Y *Enterococcus faecalis*

Aprobación de la tesis

Mg. C.D. Córdova Salinas Imer Duverli
Asesor metodólogo

MSc. Mblgo. Ruiz Barrueto Miguel Angel
Asesor especialista

Dra. C. D. Sánchez Barrueto Cristina
Presidente del jurado de tesis

Mg. C.D. Puccinelli Wang Marco
Secretario del jurado de tesis

MSc. Mblgo. Ruiz Barrueto Miguel Ángel
Vocal del jurado de tesis

DEDICATORIA

El presente informe de investigación va dedicado a Dios todo poderoso quien nos ilumina y guía día a día en el camino de preparación profesional.

A MI MADRE Y HERMANOS
Por su amor, su apoyo incondicional y ánimo constante, que siempre me ofrecen con lo cual he podido lograr uno de mis objetivos que es ser profesional.

A MIS ASESORES Y JURADOS
Por su apoyo incondicional y motivación que permitieron la culminación con éxito de la presente tesis.

AGRADECIMIENTO

Al Profesor MSc. Miguel Ángel Ruiz Barrueto, por su tiempo de asesoría que permitió la realización de esta tesis y por sus acertados aportes que han permitido llevar a cabo esta investigación.

Al Profesor Dra. Erika Enoki Miñano, por su constante apoyo y motivación para la realización de esta tesis.

A mi madre por ser el soporte económico para la ejecución de la presente tesis.

.

INDICE

DEDICATORIA II
AGRADECIMIENTO III
INDICE IV
Índice de Figuras VI
Índice de Tablas VII
RESUMEN VIII
ABSTRACT IX
INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACION 3
1.1 Situación Problemática 3
1.2 Formulación Del problema 4
1.3 Delimitación de la Investigación 4
1.4 Justificación e Importancia 5
1.5 Limitaciones de la Investigación 6
1.6 Objetivos de la Investigación 6
Capítulo II. Marco Teórico 8
2.1. Antecedentes 8
2.2. Marco Conceptual 17
2.2.1. *Rosmarinus Officinalis* (Romero) 17
2.2.2. Flora microbiana oral 21
2.2.3. *Streptococcus mutans* 22
2.2.4. *Enterococcus faecalis* 24
2.2.5. Clorhexidina 27
2.2.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS 28
CAPÍTULO III. Marco Metodológico 30
3.1. Tipo y Diseño de la investigación 30
3.1.1. Tipo de investigación: 30
3.1.2. Diseño de investigación: 30
3.2. Población y muestra 30
3.2.1. Población 30
3.2.2. Muestra 30

3.2.3. Unidad de muestra ... 31

3.2.4. Cálculo del Número Mínimo de Duplicados ... 31

3.3. Criterios de Inclusión ... 32

3.4. Criterios de exclusión ... 32

3.5. Hipótesis : ... 32

3.6. Operacionalización de Variables ... 32

3.7. Método, técnicas de la investigación ... 33

3.7.1. Obtención del extracto alcohólico *del Rosmarinus Officinalis* (romero). 33

3.7.2. Obtención del Agua ozonizada ... 33

3.7.3. Obtención del cultivo puro de *Streptococcus mutans.* ... 33

3.7.4. Obtención del cultivo puro de *Enterococcus faecalis.* ... 34

3.7.5. Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans y Enterococcus faecalis.* 34

3.7.6. Preparación de medios de cultivo para la determinación del efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *R. Officinalis* y Agua ozonizada sobre *S. mutan* y *E. faecalis* ... 34

3.7.7. Preparación y Estandarización del Inóculo. ... 35

3.7.8. Preparaciones de las Concentraciones del Extracto Alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* ... 35

mg de soluto x mL de solución solvente = mg / mL ... 35

3.7.8.1. Prueba de susceptibilidad antibacteriana mediante el Método de Difusión en disco ... 36

3.7.9. Lectura de Resultados ... 37

3.7.10. Recolección de Datos ... 37

3.7.11. Análisis Estadístico ... 37

3.7.12. Expresión de Resultados ... 37

3.7.13. Criterios éticos ... 38

3.7.14. Criterios de rigor científico ... 38

CAPÍTULO IV. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS ... 39

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ... 47

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ... 49

ANEXOS ... 57

Índice de Figuras

Figura 1. Compuestos químicos presentes en *R. Officinalis*……**31**

Figura 2. Promedios de diámetros de halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* del extracto alcohólico de *R. Officinalis*……..**69**

Figura 3. Promedios de diámetros de halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* de agua ozonizada……...….**70**

Figura 4. Promedios de diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en la evaluación de la sinergia……..…. **71**

Figura 5. Halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* a concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*, así como de la sinergia de esto mediante el Método de difusión en disco de papel de filtro. …….……....**72**

Índice de Tablas

Tabla 1 Estudios farmacológicos y terapéuticos sobre *Rosmarinus Officinalis*……..**33**

Tabla 2 Microorganismos presente en los fluidos salivales……...**45**

Tabla 3 Promedios del diámetro de halos de inhibición de las concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/ml del extracto acuoso de Rosmarinus Officinalis sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*……...…….. **95**

Tabla 4 Promedios del diámetro de halos de inhibición de las concentraciones de 0,41 mg/mL y 0,82 mg/ml de agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.* ……**95**

Tabla 5 Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 25 mg/mL extracto alcohólico de *R. Officinali*s sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.* ……**96**

Tabla 6 Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 50 mg/ml del extracto alcohólico de *R. Officinali*s sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*……...**97**

Tabla 7 Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 0.41 mg/ml del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.....**98**

Tabla 8 Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 0.82 mg/ml del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*……...…**99**

RESUMEN

Se determinó el efecto de antibacteriano del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, para lo cual se trabajó con dos concentraciones distintas de ambas compuestos (25 mg/ml y 50 mg/ml del extracto de *R. officinalis* y 0,41 mg/ml y 0,82 mg/ml de agua ozonizada), además del control positivo con clorhexidina al 0,12% y el control del solvente que fue etanol absoluto. Para el evaluar el efecto antibacteriano tanto del extracto alcohólico como del agua ozonizada se procedió a sembrar con hisopo estéril el inóculo estandarizado de *S. mutans* y de *E. faecalis* independientemente en placas con agar Mueller-Hinton a las cuales se les colocó un disco de papel de filtro estéril en el centro de las mismas y se incorporó 25 µL de cada concentración del extracto alcohólico como del agua ozonizada. Las placas sembradas e inoculadas fueron incubadas a 36ºC en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas. La lectura de los resultados se hizo midiendo el diámetro, en milímetros, del halo de inhibición formado para cada bacteria con respecto a cada concentración de los compuestos evaluados. Se encontró que a la concentración de 25 mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* se produjo un halo promedio 25 mm para *E. faecalis* y de 19 mm para *S. mutans*. Mientras que a la concentración de 50 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición promedio de 36 mm para E. faecalis y de 24 mm para S. mutans. El halo formado en el control de clorhexidina al 0,12 % fue de 16 mm y es semejante al obtenido con el solvente etanol absoluto. Con el agua ozonizada los halos fueron menores al control positivo. Se presume que el efecto del extracto pudo deberse a los compuesto fenólicos presentes en la planta cuyos efectos bactericidas están bien descritos. Se concluye que a las concentraciones de 25mg/ml y 50mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* existe efecto bactericida sobre *S. mutans* y *E. faecalis* en condiciones de laboratorio y este efecto se incrementa cuando se le agrega agua ozonizada.

Palabras claves: inhibición, agua ozonizada, *Rosmarinus officinalis, Streptococcus mutans, Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

The antibacterial effect of alcoholic extract of Ros*marinus officinalis* and the ozonated water on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* was determined, for which we worked with two different concentrations of both compounds (25 mg / ml and 50 mg / ml extract R. officinalis and 0.41 mg / ml and 0.82 mg / ml ozonated water), positive control with addition of 0.12% chlorhexidine and control solvent was absolute ethanol. To evaluate the antibacterial effect of both the alcoholic extract of ozonated water as we proceeded to sow sterile swab the standardized inoculum *S. mutans* and *E. faecalis* independently plates Mueller-Hinton agar to which were fitted with disc sterile filter paper in the center of them and joined 25 uL of each concentration of ozonated water and the alcoholic extract. Seeded and inoculated plates were incubated at 36oC under anaerobic conditions for 24 hours. The reading of the results was done by measuring the diameter in millimeters of the inhibition halo formed for each bacteria for each concentration of the compounds tested. It was found that the concentration of 25 mg / ml of alcoholic extract of R. officinalis halo occurred an average 25 mm for E. faecalis and S. mutans to 19 mm. While the concentration of 50 mg / ml halo average inhibition of 36 mm for *E. faecalis* and *S. mutans* to 24 mm was obtained. The halo formed in controlling 0.12% chlorhexidine was 16 mm and is similar to that obtained with absolute ethanol solvent. Ozonated water with halos were less than positive control. It is presumed that the effect of the extract could be due to the phenolic compound present in the plant whose bactericidal effects are well described. It is concluded that the concentrations of 25 mg/ml and 50 mg/ml of alcoholic extract of *R. officinalis* there bactericidal effect on *S. mutans* and *E. faecalis* in laboratory conditions and this effect is increased when you add ozonated water.

Keywords: inhibition, ozonated water, *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha estudiado el efecto en la salud de los posibles compuestos bioactivos presentes en las plantas y es posible asegurar que existe más información sobre sus propiedades funcionales, medicinales y/o toxicológicas. En el Perú últimamente se han realizado diversos estudios en diferentes plantas medicinales, comprobándose las propiedades de sus componentes como: antibacterianas, antihemorrágicas, analgésicas, antiinflamatorias, etc. Debido a ello, estos estudios se han venido intensificando en los últimos años, lo que ha permitido identificar y aislar los principios activos responsables de su actividad farmacológica dando lugar a variadas presentaciones avalando razonablemente su utilización.[1]

En el campo de la práctica odontológica, estas plantas han tenido todo tipo de uso, en especial en la parte preventiva como aditivos en los diversos productos de higiene oral con propiedades contra la halitosis, anti-inflamatorios y antibacterianos y es sobre todo en esta última característica en que se han visto empíricamente y determinado metodológicamente. Sin embargo debido a la biodiversidad muchas de estas plantas no se han estudiado o recién se están empezando a estudiar especialmente en nuestro país[1].

La Ozonoterapia en odontología se compone de ozono y de oxígeno puro, puede utilizarse como gas o unirse con agua y obtenerse agua ozonizada con gran poder desinfectante, o unirse aceite y formar aceite ozonizado. La terapia actual del ozono encuentra sus orígenes en el dentista alemán E.A. Fisch, quien utilizó el *agua ozonizada* por primera vez con funciones desinfectantes. Según otro dentista alemán, el Dr. Fritz Kramer, el

ozono en forma de agua ozonizada, para colutorio o como irrigador, o en forma de spray puede administrarse como tratamiento médico mediante diferentes vías: sistémica y local [65].

Rosmarinus officinalis (Romero), es una planta originaria del mediterráneo, cultivado en muchos países del mundo, planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos del cuerpo humano. Al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético.[3] Por lo que en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de aportaciones científicas que brindan amplia información de las aplicaciones del romero. Teniendo en cuenta que nuestra población necesita alternativas de costo reducido y alto beneficio para el tratamiento de lesiones bucales que lo haría accesible a las clases más populares[3].

En la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “romero” y del *Agua ozonizada* sobre el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, además de llegar realizar una sinergia para evaluar la mayor actividad antimicrobiana de las dos presentaciones así mismo de dar una terapia alternativa con el uso de sustancias inocuas como el *Rosmarinus officinalis* “romero”, y el agua ozonizada, de fácil adquisición para la población del departamento de Lambayeque, y cuyas propiedades antimicrobianas han sido demostradas en varias investigaciones anteriores.

CAPÍTULO I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

1.1 Situación Problemática

En la actualidad, existe un interés muy grande por investigar nuevas formas terapéuticas para combatir las afecciones en la cavidad oral, una de las más desarrolladas está relacionada con el uso de los extractos vegetales y otras sustancias inocuas para los tejidos orales, las plantas han sido utilizadas por la humanidad en todo el mundo desde tiempos remotos para controlar e incluso curar afecciones causadas por microorganismos[1].

Se ha establecido que el 90% de las personas, en las ciudades industrializadas están siendo afectadas por infecciones órales de tipo bacteriano. También se ha determinado que la mayoría de estas personas utilizan productos químicos para el control de estas afecciones, productos que generalmente son de costo elevado y difícil acceso para las personas de bajos recursos[2].

Esta situación ha propiciado el ambiente ideal para poder desarrollar la presente investigación, con la cual se pretende como primer paso determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* “romero” y agua ozonizada, sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, mediante un estudio *in vitro*, el cual creará las bases para realizar estudios *in vivo* e *in situ* que nos permitan proponer productos a base de extractos vegetales, como enjuagues bucales o colutorios para controlar a aquellos microorganismos importantes involucrados en casos de infecciones orales[1,3].

El *Rosmarinus officinalis* “romero” es una planta que ha sido descrita farmacológicamente con muchos principios activos, a los

cuales se les atribuye propiedades medicinales, analgésicas entre otras. Sus hojas y tallos han sido utilizados para obtener infusiones, extractos y en la actualidad mediante procesos más industrializados se puede acceder al aceite esencial. En nuestro país y principalmente en nuestra localidad no existen investigaciones serías en el cual se haya evaluado el efecto antibacteriano del extracto de *Rosmarinus officinalis* y del *agua ozonizada* sobre bacterias de interés estomatológico[4].

Streptococcus mutans es un habitante de la microbiota oral que constituye la primera causa de caries dental y de infecciones graves por estreptococos del grupo viridans, mientras que *Enterococcus faecalis* ha sido el microorganismo preponderante en las infecciones endodónticas persistentes, que gracias a sus características fenotípicas es capaz de sobrevivir frente a protocolos de irrigación, medicaciones intraconducto y materiales de obturación[5, 6].

1.2 Formulación Del problema

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* “romero” y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*?

1.3 Delimitación de la Investigación

La investigación fue desarrollada en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Señor de Sipán S.A.C, situada en carretera a Pimentel Km 5. Durante los meses de abril a diciembre del 2015.

1.4 Justificación e Importancia

En vista de la situación que se ha comentado, se intentará determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y del *agua ozonizada* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

El *agua ozonizada* cumple múltiples propiedades entre ellas el poder antibacteriano se ha demostrado ausencia de efectos teratógenos y cancerígeno, suele administrarse como tratamiento médico odontológico mediante vía local. [65]

El *Rosmarinus officinalis* es una planta con múltiples propiedades medicinales comprobadas artesanalmente pero con muy pocos estudios científicos, fueron estas dos premisas las que conllevaron a interesarnos en realizar una investigación al respecto y de esta manera crear los cimientos para futuras investigaciones tal vez ya no solo a nivel In Vitro si no también in vivo.

La presente investigación permitirá determinar la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis "Romero"* y del *agua ozonizada* a partir de diferentes concentraciones , y estos resultados podrían ser utilizados en algún momento como alternativa de control *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, y de esta manera contribuir con conocimientos que serán fundamentales en el desarrollo de nuevos productos con efectividad comprobada en microorganismos patógenos orales.

1.5 Limitaciones de la Investigación

Una de las limitaciones que fueron previstas en la investigación que se dieron durante el transcurso de la misma fue el mantenimiento de la cepa de *Streptococcus mutans* que debido a sus características fisiológicas es complicado mantenerlas viables durante mucho tiempo, pero lo logramos aplicando la técnica de resiembra continua.

1.6 Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano *In Vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) y el *agua ozonizada* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.

Objetivos Específico

1- Determinar el efecto antibacteriano *In Vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* “romero” a las concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml, sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante la medición de los halos de inhibición formados.

2- Determinar el efecto antibacteriano *In Vitro* del *agua ozonizada* a las concentraciones de 0,41mg/m, 0.82mg/ml sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante la medición de los halos de inhibición formados.

3- Determinar el efecto sinérgico antibacteriano *In Vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* “romero” a 25 mg/ml y del *agua ozonizada* a 0,41mg/ml sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante la medición de los halos de inhibición formados.

4- determinar el efecto sinérgico antibacteriano *In Vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a 50 mg/ml y del *agua ozonizada* a 0,82mg/ml sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, mediante la medición de los halos de inhibición formados.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Antecedentes

TEIXEIRA I. (Brasil - 2012), evaluó la acción antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra las bacterias orales presentes en el biofilm dental que están asociados con caries y la enfermedad periodontal. Se trata de un estudio ciego, cruzado, *In Vivo* que incluyó a 11 voluntarios, los tratamientos se realizaron en tres fases de catorce días cada uno, cada fase seguida de un intervalo de descanso. Durante esas semanas, los voluntarios realizaron enjuagues bucales con las siguientes soluciones: control negativo / placebo, solución de clorhexidina al 0,12 % (control positivo) y la solución que contiene extracto de hoja de *Rosmarinus officinalis* (solución de prueba) a una concentración de 1:5 en 10 %. Para el control de la biopelícula dental se utilizó el índice de higiene oral simplificado. Los datos clínicos y estadísticos muestran que el extracto de romero aparentemente no presentaba grandes resultados, sin embargo, la clorhexidina si mostró mejores resultados en el control de la biopelícula dental.[8]

Pinheiro M. y Col. (Brasil - 2012), evaluaron la actividad bacteriostática y bactericida de tinturas hidroalcóholicas de *Rosmarinus officinalis*, *Calendula officinalis*, *Mikania glomerata*, demostrando su acción bacteriostática y bactericida a bajas concentraciones, sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. Entretanto la actividad antimicrobiana de clorhexidina fue superior a las tinturas.[9]

DALIRSANI Z. y col. *(*Asia -2011), evaluaron *In Vitro* los efectos antimicrobianos de diez extractos de plantas contra

Streptococcus mutans. La efectividad antimicrobiana se comparó con clorhexidina al 0.12 % que utilizaron como control positivo. Para dicho trabajo se utilizó 30 gr de diez plantas incluyendo *Rosmarinus officinalis* (Romero) tomillo, menta, ajo, canela, manzanilla, árbol de té, clavo, hierbabuena, salvia y se disolvieron en 100 ml de metanol puro. Los *Streptococcus mutans* se cultivaron en agar sangre. Después de 24 h los diámetros de los halos de inhibición indicaron falta de crecimiento bacteriano. Los diámetros de cada disco se compararon con los de clorhexidina mediante el análisis de la prueba t, donde se observó que la inhibición alrededor de los discos de extracto de romero fue 11.5 mm el que más se aproxima al de la clorhexidina que fue de 14,6 mm.[10]

Volcão L. y Col. (Brasil - 2011), evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* O157:H7 *Enterococcus faecalis* y *Entorobacter aerogenes*. El aceite esencial mostró mayor actividad antimicrobiana en *Enterococcus faecalis* Gram-positivo y *Enterobacter aerogenes* bacilo Gram-negativo. También mostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 a mayor concentración del aceite esencial[11].

ESTRADA S. (Ecuador - 2011), realizó un estudio *In Vitro* para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de Romero y Tomillo frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizó tres concentraciones de extracto: 10000, 1000 y 100 µg/ml, frente a las distintas bacterias y *candida*; se comprobó sus propiedades antimicrobianas utilizando el método de Mitscher el cual consiste

en la determinación del crecimiento de los microorganismos en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano. Luego de 24 y 48 horas de incubación; se observó que los extractos de ambas plantas presentan actividad antibacteriana destacándose la mezcla de los extractos a concentraciones de 10000 y 1000 µg/ml[12].

CASTRO R. y col. (Brasil - 2010), evaluaron *In Vitro* la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Ocotea odorifera Vell* (Sasafrás), contra cepas de *Candida albicans* y *C. tropicalis*. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) se utilizó la técnica de microdilución seriada; como control positivo se utilizaron Miconazol y nistatina. Los cultivos se realizaron en agar [18] Sabouraud, fueron incubados a 35º C durante 24 a 48 horas. Las lecturas de las cepas de levadura se hicieron con el método visual, Se tomó en cuenta la no formación de cúmulos celulares "el crecimiento visual". En los resultados se observó que todas las cepas fueron sensibles al aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (Romero) a una CIM de 2,5 mg/mL.[13]

BATTAGIN J. (Brasil - 2010), evaluó *In Vitro* el efecto de inhibición de la actividad de la glucosiltransferasa y el crecimiento bacteriano de los extractos de *Rosmarinus officinalis* (Romero), *Camelia sinensis* (Té Verde) y *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) sobre la actividad de la glucosiltransferasa, contra *Streptococcus mutans*. Los resultados obtenidos con el extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) fueron prometedores, ya que mostraron una inhibición significativa de la actividad de glucosiltransferasa (50 – 75 %) en concentraciones superiores a 4 mg/ml.[14]

VOLCAO L. y col. (Brasil - 2010), determinaron *In Vitro* la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra tres cepas bacterianas estandarizadas: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes*. Para obtener la concentración mínima inhibitoria (CIM), utilizaron la técnica de microdilución con concentraciones que varían de 0.78 a 100 mg/ml Los resultados de este estudio mostraron que hay actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes* a una (CIM) 25 mg/ml. También mostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a una (CIM) de 100 mg/ml.[15]

CASTAÑO H. y col. (Colombia - 2010), evaluaron *In Vitro* la actividad bactericida del extracto etanólico y el aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis, s*obre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. La concentración mínima inhibitoria (CIM) se determinó mediante la técnica de microdilución; los resultados mostraron que el aceite esencial exhibió una mayor acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas con CIM entre 512 – 4096 ppm. El extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con CIM de 1024 ppm.[16]

COSTA A. y col. (Brasil - 2009), evaluaron *In Vitro* el potencial anti fúngico de extractos glycolicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Syzygium cumini Linn*. (Jambolan), contra cepas de

Candida albicans, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*. En los resultados que obtuvieron llegaron a la conclusión de que los extractos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Syzygium cumini Linn*. Mostró potencial antimicótico para todas las cepas de Candida estudiadas, y las cepas de *C. tropicalis* demostrado ser más sensible a los extractos en relación a *C. albicans* y *C. glabrata.*[17]

ARDILA M. y col. (Colombia - 2009), Evaluaron la actividad antibacteriana *In Vitro* de seis extractos de plantas, entre ellas utilizaron el extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y la vancomicina de 30 µg/ml, Contra *Clostridium perfringens*; el extracto de romero fue disuelto en una solución de hexano-acetona que presento una inhibición de [20] 14,4 mm, de diámetro en el crecimiento bacteriano, casi semejante a la vancomicina 14.5 mm, que fue utilizado como control positivo.[18]

BARNI M. y col. (México - 2009), estudiaron la eficacia antibacteriana *In Vivo* de un extracto etanólico de romero contra *Staphylococcus aureus,* en dos modelos de infección en piel de ratón. El extracto seco de romero contenía 23 % de compuestos fenólicos, 20 % de diterpenos fenólicos, 10 % de ácido carnósico, 10 % de carnosol y un 3 % de ácido rosmarínico, los resultados evidenciaron la acción bacteriostática del extracto de romero en la concentración de 2.3 % de polifenoles activos y la acción bactericida del extracto que contenía un 4.6 % de polifenoles activos contra *S. aureus* en los dos modelos de infección en piel de ratón, se resalta la actividad antibiótica *In Vivo* comparable al ácido fusídico.[19]

ALVES M. (Brasil - 2008). Comparó la actividad antimicrobiana *In Vitro* del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis*

(Romero) y clorhexidina al 0,12 %, contra cepas estandarizadas de: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* y *Lactobacillus casei*; los resultados demostraron un gran potencial antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) frente a todas las cepas utilizadas, con halos de inhibición de 11 a 20 mm. Similar a clorhexidina al 0,12 %, con halos de inhibición de 11 a 18 mm.[20]

Lezcano, I., Gutiérrez, C., Baluja, X. y Sánchez, E. (Cuba - 2007), "Ozone Inactivation of Microorganims in Water. Gram positive Bacteria and Yeast Ozone Research Center", aislaron cepas de Streptococcus faecalis, Staphylococcus aureus y Candida albicans, se evaluó la cinética de inactivación de estos microorganismos en agua tratada con ozono. Suspensiones de agua de 104 - 106 UFC / ml de Streptococcus faecalis ATCC 10541, Staphylococcus aureus ATCC 29213, Candida albicans ATCC 10231, las cepas silvestres se prepararon en condiciones estériles y tratados en un reactor de burbuja de 100 ml con la capa de ozono, alcanzando concentraciones de 0,3 a 2,5 mg de ozono disuelto / l de agua, en contacto con microorganismos. Cinética de la inactivación de esta cepas microbianas fue similar a las bacterias Gram negativas: en primer lugar la cinética de inactivación de esta orden respecto a ambos, las concentraciones de ozono y los microorganismos se encontraron dando como resultado una total cinética de segundo orden de inactivación. Staphylococcus aureus aislado era más resistente que el Streptococcus faecalis y Candida albicans, el tiempo necesario para conseguir la inactivación total fue de 10 minutos[21].

Gallego, J., Muñoz, S., Gaviria, D., Serna, C. (Colombia - 2007) en su estudio “Uso del Ozono en diferentes campos de la Odontología” nos refiere que el uso de los gases hiperoxidantes como es el ozono en la odontología no ha sido descrito ampliamente, sin embargo podemos utilizar esta técnica en diferentes áreas como la cirugía oral, la periodoncia, la endodoncia y en la estética dental, principalmente por tener efecto desodorizante y desinfectante. Además se ha planteado que esta técnica tiene excelentes resultados en el tratamiento de conductos dentales, la desinfección de bolsas periodontales, como astringente en cirugía oral y como gas oxidante en el blanqueamiento de superficies dentales. Por ser una técnica novedosa en el campo odontológico presenta ciertas dificultades en su manejo y consecución ya que los generadores de ozono tienen altos costos y los parámetros de utilización en el ser humano son bastante estrictos y de cuidado ya que podría representar un daño físico al paciente si no se utiliza correctamente. Al revisar la literatura podemos darnos cuenta que el uso del ozono en la odontología aún se encuentra en una etapa experimental, ya que no se ha encontrado la manera de manejarlo correctamente en seres humanos, siendo útil, por el contrario, en otros usos y aplicaciones.[22]

Clavo B, Pérez JL, (Cuba - 2006), su estudio fue evaluar el potencial antimicrobiano de ozono que se aplicará a 3 soluciones diferentes en un sistema de limpieza por ultrasonido frente a Staphylococcus aureus. Un total de 120 ml de S. aureus se mezclaron en 6 Lt de las soluciones experimentales (agua destilada estéril, vinagre y agua destilada estéril + Endozime AWpluz) utilizados en un sistema de limpieza por ultrasonidos (SCP). El ozono se produce por una descarga eléctrica a través

de una corriente de oxígeno y burbujeo con el caudal a 7 g / h de ozono (1,2%) en las suspensiones microbianas. Diez ml de cada suspensión experimental se recogieron y 5 diluciones se hicieron en 9 ml de BHI y se incubaron a 37 ° C durante 48 h. El crecimiento bacteriano se evaluó por la turbidez del medio de cultivo. Al mismo tiempo, 1 ml de las muestras bacterianas se recogieron y se inocularon en placas BHIA. Después de la incubación a 37 ° C durante 48 h, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en la superficie BHIA se contó. En la prueba de dilución en tubos de BHI y en placas BHIA (UFC / ml), el crecimiento bacteriano no se observó en cualquiera de las soluciones experimentales cuando el ozono se ha añadido. Bajo las condiciones ensayadas, se puede concluir que la adición de ozono a un sistema de limpieza por ultrasonidos que contiene diferentes soluciones experimentales como resultado de la actividad antibacteriana frente a S. aureus.[23]

Camey, L. (Guatemala - 2006) nos indica que el ozono tiene un gran efecto germicida de amplio espectro con la capacidad de eliminar y destruir en un poco tiempo bacterias, virus, hongos y esporas lo que impide la reproducción de las bacterias y modifica la estructura celular de los virus matándolos al mismo tiempo que destruye su estructura celular. Además de su efecto germicida, produce un aumento en el tejido sanguíneo y estimula los glóbulos rojos lo que provoca una mayor oxigenación de la sangre con mejor circulación aumentando las proteínas y produciendo una acción antiinflamatoria.[24]

Baysan A, Lynch E. (Colombia - 2006) observaron que el ozono utilizado durante 10 segundos sobre la superficie dental (raíz)

incidía en los tejidos dentales radiculares afectados por caries, ya que presentaban una disminución y muerte de algunos microorganismos que estaban presentes en caries no cavitadas y en las que se encontraban con cavidad, especialmente el S. mutans y el S. sobrinus.[25]

Arita M, Nagayoshi M, (Colombia - 2005) observaron que la utilización del agua ozonizada durante un minuto sobre la zona afectada por cándida albicans disminuía la adhesión de microorganismos y mantenía la superficie acrílica limpia de estos, siempre y cuando se utilizara con un método combinado con ultrasonido.[26]

Nagayoshi y col. (México - 2004) observaron las capacidades desinfectantes del agua ozonizada en dientes de bovinos infectados con *S. mutans* y *Enterococcus faecalis* después de ser irrigados con agua ozonizada, comparando la utilización de hipoclorito de sodio al 2.5%. Encontraron que el agua ozonizada permitía un excelente detrimento de los microorganismos antes mencionados y además sugieren la utilización del ozono para la desinfección de conductos pulpares en endodoncia.[27]

Holmes J. (Colombia - 2003) muestra que el ozono además de desinfectar y desodorizar puede influir en tratamientos de caries radicular primaria. En este estudio se utilizó la corriente de ozono en superficies radiculares afectadas por caries no cavitadas en pacientes de 60 a 65 años con seguimiento de 12 a 18 meses, encontrando que es una alternativa convencional efectiva para caries radicular primaria siempre y cuando se utilice el ozono acompañado de agentes remineralizantes para que la superficie radicular responda al tratamiento.[28]

Ebensberger U, Pohl Y Colombia (2002) se mostró que el agua ozonizada tiene efectos más rápidos que el agua clorada y que el ozono en concentraciones de 0.5 ppm elimina microorganismos de la cavidad oral en pocos segundos como la E coli, Pseudomonas aerus y en el momento de irrigar con agua ozonizada se presenta un efecto descontaminante en la raíz dental, además tiene un efecto positivo sobre los cementoblastos en el ligamento periodontal.[29]

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. *Rosmarinus Officinalis* (Romero)

El romero, es una planta ubicua, crece desde el nivel del mar hasta una altura de 1200 m.s.n.m. En el Perú crece en la costa, sierra y selva hasta los 3,500 msnm, formando parte del sotobosque, en laderas de tierras bajas y en lugares secos.[30,31]

2.2.1.1. clasificación taxonómica

El *Rosmarinus officinalis* “romero” taxonómicamente pertenece a la división Angiosperma, clase Dicotiledonea (Magnoliopsida), subclase Asteridae, orden Solanales (Tubiflorae), suborden Verbeninae, familia Labiatae (Lamiaceae) género Rosmarinus y especie *Rosmarinus officinalis* Linn.[32]

2.2.1.2. Composición química y principios activos

En la planta se han reportado diversos compuestos químicos, agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos.[33,34]

Se ha identificado la presencia de α-pineno, β-pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3octanona, isobanil-acetato y β-cariofileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α-amirina, β-amirina, borneol, y acetato de bornilo.[35]

En el caso de las hojas del romero, prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable. Dentro de los compuestos activos con efecto antibacteriano útil, se mencionan los Terpenoides, Diterpenos (picrosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona), Triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3acetil-ésteres). Son aquellos que tienen elementos adicionales, usualmente oxigeno; se especula que involucra la ruptura de la membrana celular por los compuestos liofilices.[36]

EFECTO	FORMA DE UTILIZACIÓN
Actividad antibacteriana	Aceite esencial Extractos alcohólicos y acuosos
Actividad antiviral	Extractos alcohólicos y acuosos
Actividad antiparasitaria	Extractos hidroetanólicos
Actividad antioxidante	Extracto acuoso

Actividad a nivel de sistema nervioso central: ▪ Estimulador ▪ Mejorador de memoria ▪ Liberación de dopamina ▪ Captación de monoaminas, Citoprotectores a nivel de membrana (eritrocitos). ▪ Activación neuronal – inhibición de neurotransmisores. ▪ Acción antiinflamatoria ▪ Acción antidiurética	 Aceite esencial Extracto acuoso Extracto acuoso Extracto de hojas Aceite esencial Extracto acuoso Extractos hidroetanólicos Aceite esencial Extracto acuoso Extractos hidroetanólicos
Cólicos menstruales	Aceite esencial
Anticonceptivo	Extracto de hojas
Prevención cardiovascular	Aceite esencial
Efecto dermoprotector	Hojas de romero
Acción en el sistema gastrointestinal Reducción de lesión ulcerosa	Extractos hidroetanólicos

Tabla 1. Algunos estudios farmacológicos y terapéuticos sobre *Rosmarinus officinalis* (Ávila, 2011).

2.2.1.3. Actividad antibacteriana

El extracto de hojas de *R. officinalis* actúa a nivel de membrana celular de las bacterias aumentando su permeabilidad y generando desconfiguración de la pared celular tanto de Gram positivas como de Gram negativas.[37]

2.2.1.4. Uso de *Rosmarinus officinalis* en odontología

En cuanto al “romero” se ha visto que en nuestro país se ha utilizado de manera artesanal[6]. Pero en otros países como el Brasil los componentes de esta planta son utilizados en diversas formulaciones farmacéuticas, como los enjuagues bucales, colutorios, soluciones tópicas, pasta dental, entre otros.[38]

2.2.1.5. El Ozono en el agua

El ozono es un gas que se genera a partir del oxígeno cuando se le aplica una descarga de alto voltaje. Merced a ella, parte

del oxígeno (O_2) se transforma en ozono (O_3). Después ese gas se disuelve en agua obteniéndose así un agua ozonizada que adquiere diversas propiedades terapéuticas dependiendo de la concentración de ozono. Algunos científicos utilizan este producto como sustancia desinfectante.[39]

A diferencia de la cloración la ozonificación elimina olores y sabores desagradables del agua. Su efecto residual es de corto tiempo. Con la aplicación de ozono en agua se obtiene una desinfección al eliminar hongos, bacterias, algas y helmintos, gérmenes, virus; una potabilización y sedimentación de material orgánico y sales, decoloración y desodorización del agua; elimina fenoles y representa un ahorro importante en compuestos cloradores, fungicidas y plaguicidas.[40]

En el agua presenta gran solubilidad y se estima una permanencia aproximada de 20-30 minutos. El ozono se desdobla en oxígeno, siendo por lo tanto más beneficioso cuando se compara con el cloro y el dióxido de cloro.[40]

2.2.1.6. Ozonoterapia en la clínica dental

La terapia actual del ozono encuentra sus orígenes en el dentista alemán E.A. Fisch, quien utilizó el *agua ozonizada* por primera vez con función desinfectante. Según otro dentista alemán, el Dr. Fritz Kramer, el ozono en forma de agua ozonizada, para colutorio o como irrigador, o en forma de spray puede ser usado de los siguientes modos: [41]

Como un poderoso desinfectante de superficies y por su capacidad para contener hemorragias, en la limpieza de heridas de huesos y tejidos blandos, para reforzar el aporte de oxígeno en el área de una herida quirúrgica con el fin de mejorar la

cicatrización y como antiséptico para tratar paradentosis, estomatitis, canales endodónticos, alveolitis y en la preparación de la cirugía oral.[42, 43]

2.2.1.7. Mecanismo de acción del ozono sobre los microorganismos

El ozono producía oxidación letal sobre el protoplasma bacteriano (Sykes, 1995), sin embargo, actualmente se acepta que el gas produce alteración de la membrana por ozonólisis de los ácidos grasos insaturados de la pared bacteriana, y que actúa como microbicida, bactericida, virucida, fungicida y parasiticida.[44]

2.2.2. Flora microbiana oral

Los microorganismos que forman 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). 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. *Mycoplasma* sp., y los escasos protozoos aislados en la cavidad oral.[45, 46]

2.2.3. *Streptococcus mutans*

Los *Streptococcus* son bacterias que presentan en forma de coco esférica u ovoidea, se agrupan en cadenas de longitud variable esta formación de cadenas se debe a que los microorganismos permanecen adheridos por una parte de la pared celular, no tienen movimiento, no forman esporas y generalmente reaccionan positivamente a la coloración de Gram, presentan prolongaciones extracelulares del tipo de las fimbrias y pueden tener capsula [47, 48], los medios de vida son el tracto respiratorio, gastrointestinal y bucal del hombre, crecen a una temperatura de 37°C. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que descienden el pH[49]. Son anaerobios facultativos, la temperatura óptima de desarrollo es de 36 +-1°C. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, que se puede encontrar como coco (forma redonda) en un medio alcalino, o en forma de cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido[50].

Streptococcus mutans, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción dental, se encuentra de forma permanente, debido a que requiere de tejido duro no descamativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de *Streptococcus mutans* en los niños es la saliva de la madre transmitida cuando hay un contacto salival con la comida que se le dará al bebé, estas evidencias provienen de estudios que demuestran un patrón idéntico de DNA cromosomal en las bacterias de los niños y de las madres.[51]

Se ha demostrado que el tiempo exacto de colonización de esta bacteria es a los 26 meses de edad, coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte y cemento), induce a las lesiones cariosas tanto en superficies lisas, de fosas y fisuras como en zonas interproximales y en el cemento radicular. A nivel extraoral el *Streptococcus mutans* está relacionado con endocarditis subagudas y raramente con otros procesos patológicos.[51]

Factores de virulencia del *Streptococcus mutans*[52]

Los factores de virulencia o características del *Estreptococos mutans* que lo hacen patógeno son:

Acidogenicidad: el *Streptococcus* puede fermentar los azúcares de la dieta y producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo ocasionando que el pH baje y se desmineralice el esmalte.

Aciduricidad: capacidad del *Streptococcus* para producir ácido en un medio. pH bajo.

Acidofilicidad: el *Streptococcus* puede resistir la acidez del medio, propiedad que es muy necesaria para sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo. Producen dextranasas y fructanasas enzimas que son capaces de metabolizar los polisacáridos extracelulares favorece la producción de ácido y constituye un sustrato en los periodos en que disminuye el aporte de oxígeno.

Corto efecto post-pH: requiere de poco tiempo para recuperar su actividad de crecimiento habitual tras ser sometido a un pH bajo.

Factores de cariogenicidad del *Streptococcus mutans*[53]

Las principales características que tiene el *Streptococcus mutans* para iniciar un proceso carioso son:

Producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa que se adhiere firmemente al diente y la bacteria fácilmente se adhiere a ellos.

Elementos que determinan fenómenos de adhesión, agregación y coagregación. Producción y metabolismo de polisacáridos intracelulares. Producción de dextranasas y fructanasas. Rápido metabolismo de los azucares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Efecto post-pH corto. Pueden conseguir un pH crítico de 5.5 necesario para iniciar el proceso de desmineralización del esmalte, estos microorganismos lo logran más rápidamente que cualquier otro presente en la placa dental.

2.2.4. *Enterococcus faecalis*

Parece que la primera vez que se utilizó el término entérocoque fue en 1899, en un artículo publicado en la bibliografía en lengua francesa. El original se refería a un “diplococo” que había sido localizado como microorganismo comensal en el tracto gastrointestinal y que aparentemente era patogénico para el ser humano. La primera descripción clínica y patológica de una infección por enterococos fue publicada en ese mismo año (1899) y se refería a un paciente que había sido hospitalizado “en el servicio clínico del Dr. Osler” con cuadro clínico de endocarditis y que falleció debido a dicha infección. Los autores del artículo aislaron cocos grampositivos que «formaban parejas y cadenas cortas» a partir de la sangre y de diversos órganos (en la autopsia) del paciente.[46, 47,54]

La virulencia de este microorganismo fue confirmada tras su inoculación en varios modelos animales, con reproducción de los hallazgos patológicos observados en el paciente. Este microorganismo fue denominado inicialmente "*Micrococcus zymogenes*" debido a sus propiedades fermentativas. En 1906, Andrews y Horder efectuaron un detallado estudio de los estreptococos patogénicos para el ser humano y utilizaron por primera vez el nombre de "*Streptococcus faecalis*" para designar la especie más frecuente de estreptococos existente en el intestino del ser humano y de otros vertebrados[55].

Los Enterococcus son cocos gram positivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas. Ellos pertenecieron, clásicamente, a los 2 2 Streptococcus grupo D de Lancefield; sin embargo, a mediados de la década de 1980 fueron oficialmente clasificados en su propio género. Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6.[56]

Tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de bilis al 40%, sobrevivir 30 min a 60°C e hidrolizar la L-pirrolidonil β-naftil-amida (PYR); esta habilidad ha sido usada como parte de un test rápido para detección de Enterococcus en el laboratorio. Las especies de enterococos clínicamente importante son: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E.*

malodoratus, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. solitarius*, *E. pseudoavium*. E *faecalis* es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos. *E. faecium* es la segunda especie aislada en frecuencia, representando el 5% al 16% de los aislamientos clínicos.[56]

Entre los métodos convencionales para la identificación de los enterococos a nivel de especie están la diferenciación bioquímica manual fundamentada en varias pruebas (p. ej., la formación de ácido y la hidrólisis de la arginina); no obstante, dado lo farragoso de estas estrategias, los laboratorios suelen utilizar métodos automatizados o bien métodos bioquímicos rápidos (como el sistema API), que parecen ser suficientemente precisos para la identificación de E. *faecalis* pero no para la de otras especies de *Enterococcus.*[55]

Los Enterococcus son parte de la flora normal endógena humana, y tienen poco potencial patogénico en el huésped normal. Sin embargo, en el anciano o en el paciente inmunocomprometido, estos organismos se vuelven patógenos oportunistas. Las infecciones ocurren cuando las defensas del huésped descienden por una enfermedad y por el uso de dispositivos invasivos. Se conoce muy poco acerca de los factores de virulencia de los Enterococcus. La presencia de hemolisinas o la agregación de sustancias fueron postuladas como factores de virulencia. Adicionalmente, los carbohidratos de la pared celular o los sitios de unión de la fibronectina que favorecen la adherencia a los tejidos del huésped, pueden incrementar la patogenicidad[56].

E. faecalis es un microorganismo oportunista, causa infecciones nosocomiales con diferentes grados de compromiso. Crece con facilidad en medios con poca cantidad de oxígeno, nutrientes y forma películas entre sí o con microorganismos de otras especies. Otro factor que favorece su crecimiento, es el potencial de óxido reducción elevado. Se asocia fuertemente a casos de fracaso de tratamientos de conductos, aunque eventualmente, se ha visto en presencia de lesiones primarias de origen pulpar. *Enterococcus faecalis* se puede encontrar asociado a *Streptococcus*, *Lactobacillus* y otras bacterias facultativas así como bacterias anaerobias lo que puede crear una flora mixta aún más virulenta[56].

2.2.5. Clorhexidina

Es un antiséptico potente y noble. Normalmente se usa en concentraciones de 0.2 y 0.12%, a las cuales tiene una excelente actividad como bactericida, pero baja actividad como fungicida. Es necesario que la clorhexidina sea protegida de la luz, ya que se descompone fácilmente. A temperaturas altas se descompone en cloroanilina, y la presencia de materia orgánica la inactiva fácilmente.[57]

El mecanismo de acción de la clorhexidina consiste en la disrupción de la membrana de la célula microbiana. La clorhexidina precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, además de que inhibe la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular. Aunque esta molécula es de amplio espectro, tiene más efectividad sobre gérmenes Gram positivos que sobre Gram negativos.[58]

2.2.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Efecto antibacteriano: Capacidad de matar o destruir o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.[59]

Antiséptico: Un antiséptico es un tipo de desinfectante que, cuando se aplica sobre superficies del cuerpo o en tejidos expuestos, destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos en tejidos vivos, sin causar efectos lesivos. [59]

Unidad formadora de colonia: Es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia. [59]

Cepa: Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento. [59]

Colonia: Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente. [59]

Concentración: Corresponde al antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana. [59]

Incubación: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación. [59]

Inóculo: Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo. [59]

Disco de sensibilidad: Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión. [59]

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. [59]

Medio de cultivo: Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro. [59]

ATCC: American Type Culture Collection.[59]

UFC: Unidad formadora de colonias.[59]

Efecto sinérgico: Forma de interacción que da como resultado efectos combinados o aditivos con la administración de dos o más tratamientos. [60]

Halos de inhibición: zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma, es una medida de la potencia del antibiótico frente al gérmen. [60]

CAPÍTULO III. Marco Metodológico

3.1. Tipo y Diseño de la investigación

3.1.1. Tipo de investigación:

La investigación fue de tipo experimental, según su objetivo; aplicada, según el corte de tiempo; transversal, según el conocimiento generado, cuantitativa.

3.1.2. Diseño de investigación:

Según su diseño, experimental de estímulo creciente.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Ochenta placas Petri con medio de cultivo Mueller Hinton sembrada con 100 µL de una suspensión de Streptococcus mutans a una concentración de 1,5 x 108 UFC/mL.

Ochenta placas Petri con medio de cultivo Mueller Hinton sembrada con 100 µL de una suspensión de Enterococcus faecalis a una concentración de 1,5 x 108 UFC/mL.

3.2.2. Muestra

Veinte placas Petri con medio de cultivo Mueller Hinton sembrada con 100 µL de una suspensión de Streptococcus mutans a una concentración de 1,5 x 108 UFC/mL.

Veinte placas Petri con medio de cultivo Mueller Hinton sembrada con 100 µL de una suspensión de Enterococcus faecalis a una concentración de 1,5 x 108 UFC/mL.

3.2.3. Unidad de muestra

Una placa Petri con medio de cultivo Mueller Hinton sembrada con 100 µL de una suspensión de *Streptococcus mutans* a una concentración de 1,5 x 10^8 UFC/mL.

Una placa Petri con medio de cultivo Mueller Hinton sembrada con 100 µL de una suspensión de *Enterococcus faecalis* a una concentración de 1,5 x 10^8 UFC/mL.

3.2.4. Cálculo del Número Mínimo de Duplicados

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:

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

Donde,

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

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

Zβ = 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, Zα = 1.96; Zβ = 0.842; W = 0.80 (80%)

Reemplazando la ecuación propuesta se obtuvo que el número mínimo de duplicados fué 9, y en la presente investigación se decidió realizar 10 duplicados.

3.3. Criterios de Inclusión

La cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, fue identificada tanto fenotípicamente como por el método automatizado *Microscan*.

3.4. Criterios de exclusión

Se descartaron aquellas placas Petri en las cuales se observó contaminación bacteriana que no permitió la medición de los halos de inhibición.

3.5. Hipótesis :

El extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis* en una concentración 50 mg/mL y el *agua ozonizada* en una concentración 0.82 mg/mL tiene efecto antibacteriano *in vitro* de tipo bactericida sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de discos en superficie.

3.6. Operacionalización de Variables

VARIABLES		TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	DIMENSIÓN	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE	Concentración extracto alcohólico de *R. officinalis*	Cuantitativo	Concentración / *R. officinalis*	25 mg/ml y 50 mg/ml	Espectrofotómetro
	Concentración extracto alcohólico de *Agua ozonizada*		Concentración/*Agua ozonizada*	0,41 mg/ml y 0,82 mg/ml	
VARIABLES DEPENDIENTES	Efecto antibacteriano sobre *S. mutans*		Halo de inhibición	En mm	Vernier
	Efecto antibacteriano sobre *E. faecalis*	Cuantitativo	Halo de inhibición	En mm	

3.7. Método, técnicas de la investigación

3.7.1. Obtención del extracto alcohólico *del Rosmarinus Officinalis* (romero).

Las hojas de *R. Officinalis* fueron lavadas con agua y desinfectadas con alcohol de 70º y secadas por 4 horas en estufa a 50 ºC, inmediatamente después se procedió a realizar la molienda del material vegetal seco en mortero con pilón de porcelana. El producto molido obtenido fue colocado en un frasco de vidrio forrado con papel de aluminio a razón de 250g de material triturado por cada 1000 mL, de etanol absoluto y se dejó macerar por una semana con agitación constante [71,72].

Pasado el tiempo de maceración se procedió a filtrar primero con papel filtro Whatman N° 41, luego con papel filtro Whatman, N° 2 y por ultimo con papel Whatman N° 1. El sobrenadante filtrado fue colocado en un Rotavapor con el cual se eliminó el solvente y se obtuvo el extracto seco que fue pesado y a partir del cual se prepararon las concentraciones de 25mg/ml, 50 mg/ml para uso inmediato.

3.7.2. Obtención del Agua ozonizada

El *agua ozonizada* fue obtenida mediante un equipo ozonizador de agua potable *OzoneRai*. Con el cual Donde se obtuvieron las concentraciones estándares del equipo de 0,41 mg O_3/mL y 0.82 mg O_3/mL.

3.7.3. Obtención del cultivo puro de *Streptococcus mutans.*

El cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, fue proporcionado por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo y

confirmado fenotípicamente en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional de Lambayeque mediante el sistema automatizado *Microscan*.

3.7.4. Obtención del cultivo puro de *Enterococcus faecalis.*

El cultivo puro de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, fue proporcionado por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Señor de Sipán y confirmado fenotípicamente por el laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional de Lambayeque mediante el sistema automatizado *Microscan*.

3.7.5. Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans y Enterococcus faecalis.*

Las bacterias utilizadas para la presente investigación fueron *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Ambas cepas bacterianas fueron reactivadas en agar sangre (se utilizó agar base sangre de MERK, al cual se le incorporó 5% de sangre de carnero desfibrilada) y fueron cultivadas en anaerobiosis con el sistema Anaerocult de MERCK a una temperatura de 36ºC.

3.7.6. Preparación de medios de cultivo para la determinación del efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *R. Officinalis* y Agua ozonizada sobre *S. mutan* y *E. faecalis*

Según lo las recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) para la evaluación de antimicrobianos, se procedió a preparar los medios de cultivo para las determinaciones de ambos bacterias el cual fue Agar Mueller-

Hinton y caldo Mueller-Hinton según MERCK. El caldo fue utilizado para preparar la suspensión bacteriana y el agar para las evaluaciones.

3.7.7. Preparación y Estandarización del Inóculo.

Se hizo siguiendo el método descrito por Al – Delaimy, en 1970 que utiliza la técnica de turbimétrica (nefelometría). A partir del cultivo puro de 18 horas de *Streptococcus mutans y Enterococcus faecalis*, se seleccionaron 3 colonias bien aisladas y se preparó una suspensión en 5 mL de caldo Mueller–Hinton.

La suspensión preparada fue comparada con el estándar 0,5 del Nefelómetro de MacFarland que corresponde aproximadamente a 1,5 x 10^8 UFC/mL. La turbidez alcanzada fue verificada en un espectrofotómetro marca UNICO S2100 UV+, donde a una longitud de onda de 625 nm se obtuvo una absorbancia de 0,09 (el método recomienda que debe encontrarse entre 0,08 – 0,10). El inóculo fue utilizado inmediatamente después de su preparación.

3.7.8. Preparaciones de las Concentraciones del Extracto Alcohólico de *Rosmarinus Officinalis*

Obtenido el extracto seco de *Rosmarinus officinalis*, éste fue pesado y disuelto en el solvente de extracción para obtener la concentración a evaluar siguiendo la presente fórmula.

mg de soluto x mL de solución solvente = mg / mL

3.7.8.1. Prueba de susceptibilidad antibacteriana mediante el Método de Difusión en disco

A partir del inóculo elaborado anteriormente (el cual correspondió a *S. mutan* y *E. faecalis* independientemente) se sembró con un hisopo estéril en placas con agar Mueller Hinton (MERCK). Para ello se introdujo un hisopo en el tubo donde se preparó la suspensión bacteriana, se humedeció y luego se presionó el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de líquido, inmediatamente después se inoculó la superficie seca del agar Mueller Hinton por hisopado en tres direcciones opuestas entre sí con lo que se aseguró una completa distribución de las bacteria en la superficie del agar[25, 27].

Posteriormente a la inoculación, después de 10 minutos de secar las placas en la estufa a 37 ºC, se colocaron discos de papel de filtro en la superficie de los agares con ayuda de una pinza estéril. Dichos discos tenían una dimensión de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se incorporó 25 µL del extracto y del agua ozonizada respectivamente. Se dejó reposar por 30 minutos y después las placas fueron llevadas a incubación a 36 ºC por 24 horas en condiciones de anaerobiosis mediante el sistema *Anaerocult* de MERCK., pasadas las cuales se procedió a examinar cada placa, midiendo con un vernier los diámetros de las zonas (halos) de inhibición[25, 27].

3.7.9. Lectura de Resultados

Método del Disco en superficie

Se midieron los halos de inhibición formados en las placas y se compararon con los halos formados en el control del Gold Estándar la Clorhexidina 0.12% y el control del solvente de extracción que fue etanol absoluto. No se realizó control negativo con agua destilada debido a que no se utilizó ni para la preparación del inóculo ni para la obtención de los extractos.

3.7.10. Recolección de Datos

Se realizó la medición de los halos de inhibición formados en los diferentes ensayos y se colocaron en formatos elaborados para ello.

3.7.11. Análisis Estadístico

El análisis de datos se realizó con el Software SPSS V20. Para establecer si hubo diferencias de los halos de inhibición por solución se realizó un ANAVA (análisis de varianza). Se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y un análisis de significancia entre los controles y los ensayos problema, con lo que se evaluó las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

3.7.12. Expresión de Resultados

Los resultados se expresaron en tablas y figuras.

3.7.13. Criterios éticos

La presente investigación se realizó cumpliendo las recomendaciones dadas en la declaración de Helsinki-corea 2008 - principios éticos.

3.7.14. Criterios de rigor científico

La metodología empleada es validad a nivel internacional, cuyos procedimientos aseguran la fidelidad de los resultados. La forma de presentación de las referencias bibliográficas utilizadas fue siguiendo el formato Vancouver, establecido a nivel internacional para aquellas investigaciones en el campo de las Ciencias de la Salud. La presente investigación cumple todos los criterios de rigor científico, siendo por tanto una investigación inédita y debe ser considerada como tal.

CAPÍTULO IV. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1. Resultados en tablas y gráficos.

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* fueron sensibles a las concentraciones de 25 mg/ml y 50 mg/ml del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* ya que en todas las placas evaluadas hubo formación de halos de medición alrededor de cada concentración.

Se obtuvo un halo de inhibición promedio de 32.7 mm en el caso de la concentración de 50 mg/ml de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* para *Enterococcus faecalis* y un halo de inhibición promedio de 26.7 mm en el caso de la concentración de 50 mg/ml de extracto alcohólico *de Rosmarinus officinalis* para *Streptococcus mutans*.

Los halos de inhibición del Etanol utilizado como solvente del extracto tuvieron un promedio de 15.5 mm, mientras que los halos de inhibición producidos por el *gold standard* Gluconato de Clorexidina al 0.12 % obtuvieron un promedio de 16.5 mm tanto para *Streptococcus mutans* como para *Enterococcus faecalis* (Figura 2,3,4,5).

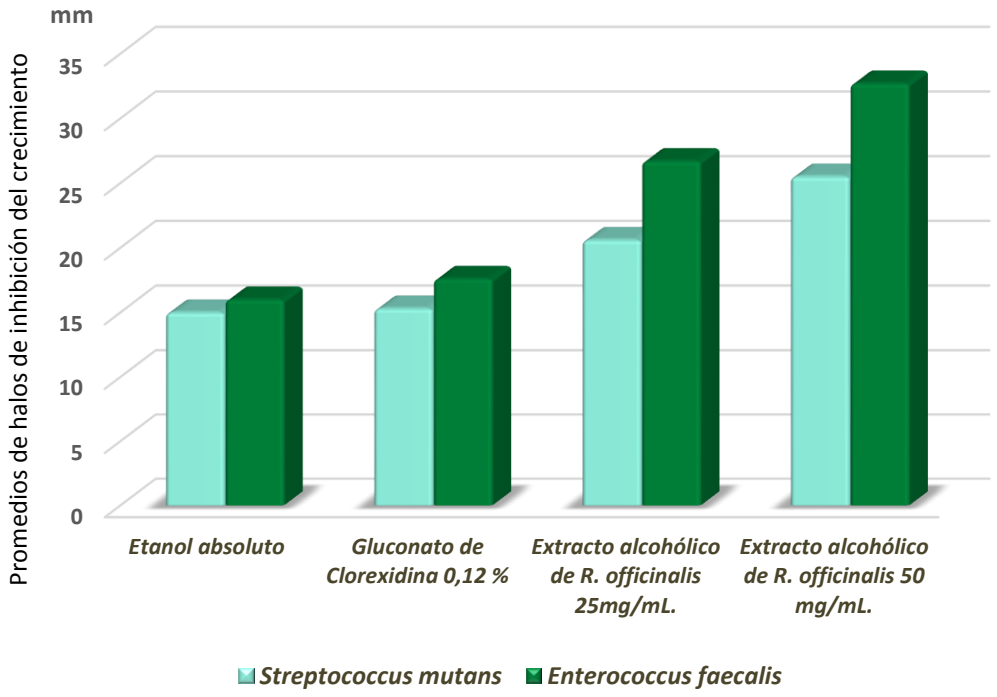

Fig. 2. Promedios de diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* a concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*, de Etanol absoluto y del *gold standard* Gluconato de Clorexidina 0,12%.

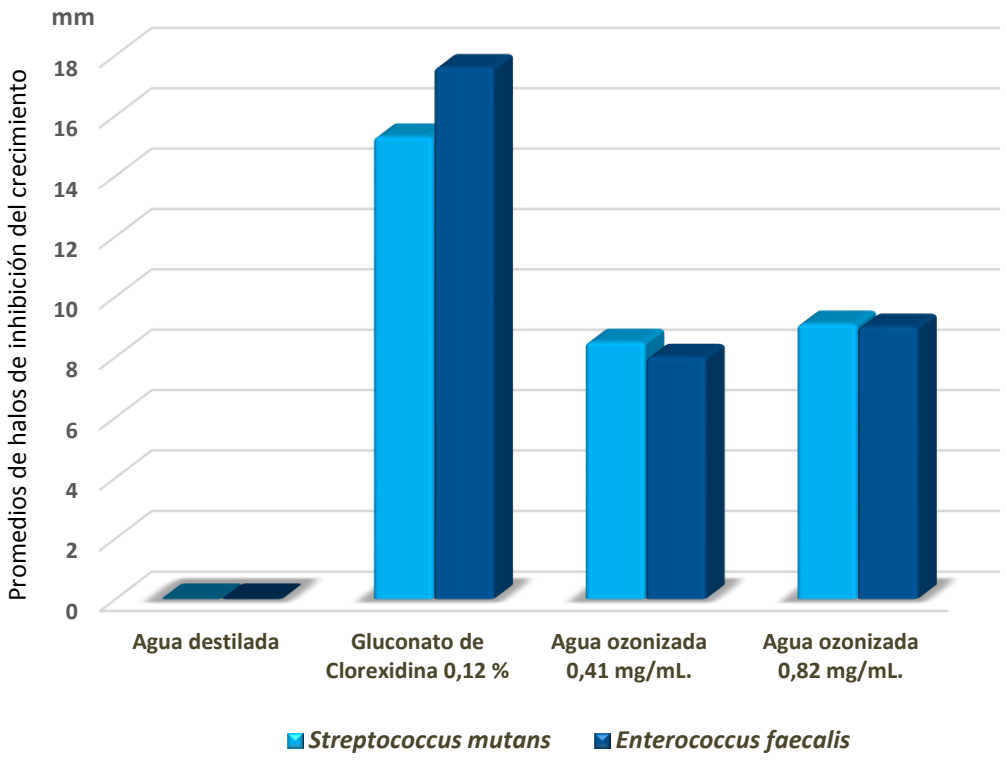

Fig. 3. Promedios de diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* a concentraciones de 0.41 mg/mL y 0.82mg/mL de agua ozonizada, agua destilada y del *gold standard* Gluconato de Clorexidina 0,12%.

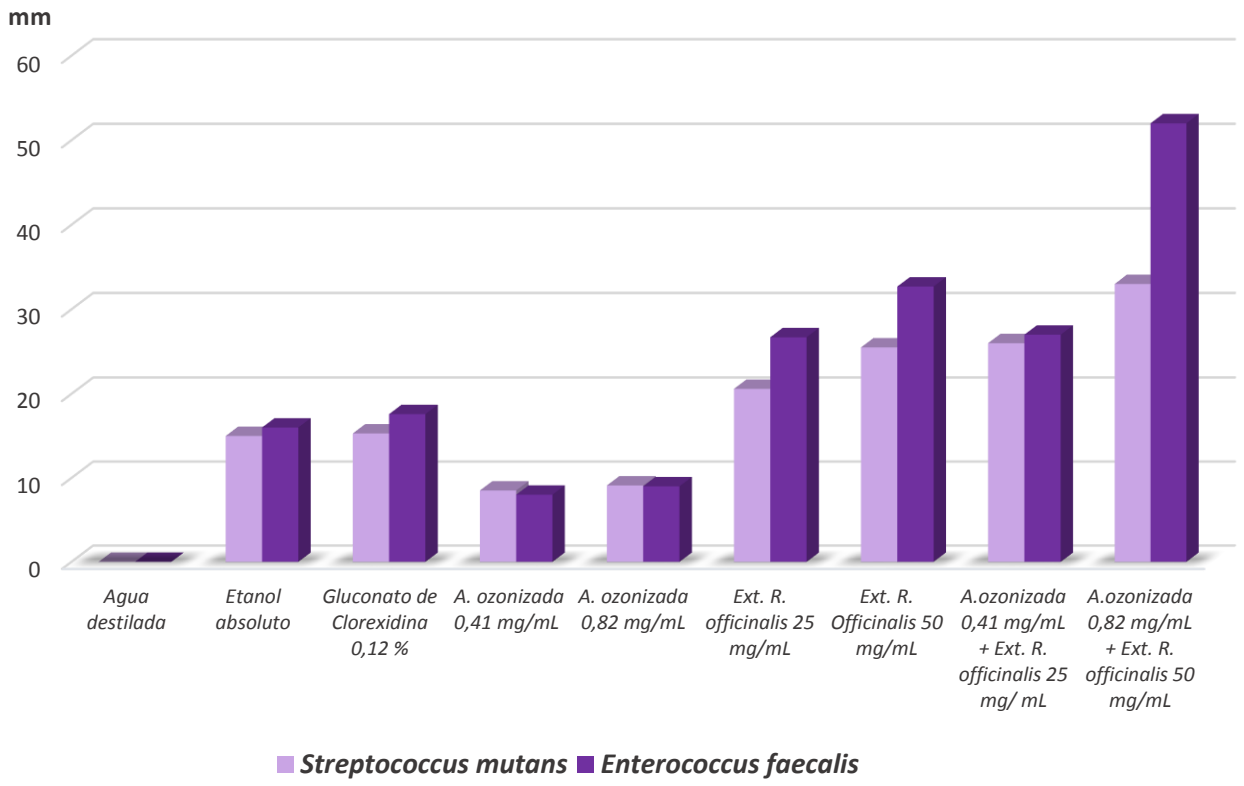

Fig. 4. Promedios de diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en la evaluación de la sinergia de las concentraciones de 0.41 mg/mL y 0.82mg/mL de agua ozonizada con las concentraciones de 25 mg/ ml y 50 mg/ml de extracto de *R. officinalis* y sus respectivos controles.

Tabla 1. Promedios del diámetro de halos de inhibición de las concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/ml del extracto acuoso de Rosmarinus officinalis sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

Concentración	***S. mutans***	***E. faecalis***
Etanol absoluto	15	16
Gluconato de Clorexidina 0,12 %	15.3	17.6
25mg/mL.	20.6	26.7
50 mg/mL.	25.5	32.7

Tabla 2. Promedios del diámetro de halos de inhibición de las concentraciones de 0,41 mg/mL y 0,82 mg/ml de agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

Concentración	***S. mutans***	***E. faecalis***
Agua destilada	0	0
Gluconato de Clorexidina 0,12 %	15.3	17.6
0,41 mg/mL.	8.5	8
0,82 mg/mL.	9.1	9

4.2. Discusión de resultados

En la actualidad, los productos activos vegetales asumen un papel importante en el tratamiento preventivo y terapéutico alternativo en la odontología, debido a sus múltiples propiedades, entre ellas el efecto antibacteriano sobre los agentes causales de las múltiples patologías orales, especialmente contra los que producen la caries dental y enfermedades periodontales.

En la presente investigación se determinó la efectividad antibacteriana del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a las concentraciones de 25 mg/ml y 50 mg/ml, sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Los resultados demostraron que el *S. mutans* y *E. faecalis*, son susceptibles a la acción del extracto alcohólico de *R. officinalis*, a la concentración de 25 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición promedio de 20.6 mm de diámetro para *S. mutans* y de 26.7 mm de diámetro promedio para *E. faecalis*, mientras que a una concentración de 50 mg/ml del extracto alcohólico de romero se obtuvo halos de inhibición de 25.5 mm de diámetro como promedio para *S. mutans* y de 32.7 mm de diámetro como promedio para *E. faecalis*. Esto se contrasta con Z. Dalirsani y col. *(*Asia -2011), cuyos máximos halos de inhibición de los extractos evaluados llegaron a 14 mm y fueron semejantes al generado por el control positivo clorhexidina, que para esta investigación fue aproximado ya que nuestro control positivo clorhexidina al 0,12 % generó halos de inhibición entre 15 y 18 mm de diámetro.

Estadísticamente se encontró diferencias significativas entre los tratamientos del extracto alcohólico de *R. officinalis*. En relación al control positivo que fue clorhexidina al 0,12 %, se observa que también inhibió el crecimiento *S. mutans* y *E. faecalis*, con un halo de inhibición en promedio de 15.3 mm de diámetro como para *S. mutans* y de 17.6 mm de diámetro como promedio para *E. faecalis*; mientras que para el control del diluyente del extracto que fue etanol absoluto se observó la formación de un halo de inhibición de 15 mm de diámetro como promedio para *S. mutans* y de 16 mm de diámetro como promedio para *E. faecalis*. El análisis estadístico demostró que no existe diferencia significativa entre el tratamiento de control de diluyente y el gluconato de Clorhexidina al 1,12%.

Con respecto a la efectividad antibacteriana del *agua ozonizada* a las concentraciones de 0,41mg/m, 0.82mg/ml sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, los resultados obtenidos demostraron que el *Streptococcus mutans y Enterococcus faecalis*, tienen una susceptibilidad limite a la acción *agua ozonizada*, esto debido a que a la concentración de 0,41mg/mL se obtuvieron halos de inhibición de 8.5 mm de diámetro como promedio para *Streptococcus mutans* y de 8 mm de diámetro como promedio para *Enterococcus faecalis*, mientras que a una concentración de 0.82mg/ml se obtuvo halos de inhibición de 9.1 mm de diámetro como promedio para *S. mutans* y de 9 mm de diámetro como promedio para *E. faecalis*. Esto no se contrasta con CARDOSO Y COLS, ARGENTINA 2008 cuyos resultados utilizando agua ozonizada tubo efecto antibacteriano contra *E. faecalis*, estadísticamente

estos datos no son significativos cuando se comparan con el control.

Se determinó además la efectividad antibacteriana de la sinergia del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a las concentraciones de 25 mg/ml y *agua ozonizada* a las concentraciones de 0,41mg/m, sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Los resultados demostraron que el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, son susceptibles a la sinergia del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a las concentraciones de 25 mg/ml y *agua ozonizada* a las concentraciones de 0,41mg/m, se obtuvo un halo de inhibición promedio de 20.6 mm de diámetro para *Streptococcus mutans* y de 26.7 mm de diámetro promedio para *Enterococcus faecalis*, mientras que la sinergia del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a las concentraciones de 50 mg/ml y *agua ozonizada* a las concentraciones de 0,82mg/m, sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis,* se obtuvo halos de inhibición de 25.5 mm de diámetro como promedio para *Streptococcus mutans* y de 32.7 mm de diámetro como promedio para *Enterococcus faecalis, estos resultados fueron muy diferentes a los que obtuvo* ALVES M. Brasil - 2008 donde el efecto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y clorhexidina al 0,12 %, contra cepas estandarizadas se obtuvo halos de inhibición de 11 a 20 mm. Similar a clorhexidina al 0,12 %, con halos de inhibición de 11 a 18 mm.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Se determinó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a las concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml, sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco obteniéndose a la concentración de 50 mg/ml un promedio de halos de 25,5 mm y 32,7mm lo que indica mayor inhibición de ambas bacterias a esta concentración.

No hubo efecto antibacteriano *in vitro* del agua ozonizada a las concentraciones de 0,41mg/m, 0.82mg/ml sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco obteniéndose halos de inhibición menores a los del Gold standard gluconato de Clorexidina a. 0,12%.

Se Determinó el efecto sinérgico antibacteriano In Vitro del extracto alcohólico de Rosmarinus Officinalis (Romero) a 25 mg/ml y del agua ozonizada a 0,41mg/ml sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco obteniéndose halos de inhibición mayores a los del gold standard gluconato de Clorhexidina a. 0,12%.

Se Determinó el efecto sinérgico antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a 50 mg/ml y del agua ozonizada a 0,82mg/ml sobre el desarrollo de

Streptococcus mutans y *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco obteniéndose halos de inhibición mayores a los del gold standard gluconato de Clorhexidina a 0,12 %. Y la de la sinergia del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) a 25 mg/ml y del agua ozonizada a 0,41mg/ml fue semejante a la obtenida a la concentración de 25 mg/ml de extracto alcohólico de *R, officinalis*.

6.2. Recomendaciones

Se recomienda replicar la presente investigación considerando más concentraciones del extracto alcohólico de *R. Officinalis* y de agua ozonizada y evaluar con otras cepas de importancia estomatológica.

Realizar estudios utilizando aparatos ozonizadores profesionales de uso odontológico, para comparar resultados con los aparatos de uso comercial.

Realizar estudios e investigativos *In vivo*,

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Font Quer P. Plantas medicinales: El Dioscórides renovado. 3ra ed. Barcelona España: Labor. 1992: 98-100.
2. Wall M, Wani M. Camptothecin. Discovery to clinic. Ann N Y Acad Sci. 1996; 803: 1-12.
3. Cordeiro C, Sacramento I, Corrêa M, Pizzolito A, Bauab T. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2006 jul/set; 42
4. Rodrigues V, Carvalho D. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais do Domínio Cerrado na Região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. Ciências Agrotécnica. 2001; 25 .
5. Buffon M, Pecharki G, Mariot C, Gomes E. O uso de fitoterápicos em odontología. Rev. Pro-odonto ciclo 4, módulo 4; 2011.
6. Pamo R. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009; 26 (3): 314-23.
7. Calixto M. Plantas medicinales utilizadas en Odontología. Kiru. 2006; 3: 80 85.
8. Teixeira L. Avaliação do uso do Extrato de Alecrim de Jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do Biofilme Dental. Tesis de licenciatura en Odontología. Curitiba: Universidad Federal de Paraná; 2012
9. Pinheiro MA, Brito DBA, Almeida LFD, Cavalcanti YW, Padilha WWN. Efecto antimicrobiano de productos de teñido naturales en las bacterias causantes de la caries. Rev Bras Promoç Saúde 2012 abr./jun; 25(2): 197-201.

10. Dalirsani Z, Aghazadeh M, Adibpour M, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Mehdipou R. In Vitro comparison of the antimicrobial activity of ten herbal extracts against *Streptococcus mutans* wth chlorhexidine. Journal of applied sciences. 2011; 11 (5): 878-882

11. Volcão LM, Marques JL, Ribeiro GA. Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en patógenos alimentarios. XX Congreso de iniciación científica, II Muestra Cientifica UFPEL 2011.

12. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana In Vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (thymus vulgaris). Tesis de licenciatura en Bioquímico Farmacéutico. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2010

13. Castro R, Lima E. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (Ocotea odorifera Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o género Cándida. Rev. Bras. Pl. Med. 2011; 13 (2): 203-208.

14. Battagin J. Cinética enzimática e efeito de extratos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de streptococcus mutans. programa de pósgraduação stricto sensu em ciências da saúde da Universidade São Francisco Bragança Paulista; 2010

15. Volcao l, Marques J, Ribeiro G. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre patógenos alimentares. XX congresso de iniciação científica 2011 (consultado el 12 de septiembre del 2011). disponible en: http://www.ufpel.edu.br/cic/2011/.../cb_00269.pdf

16. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias de interés Alimentario. Vitae. 2010; 17 (2): 149-154.

17. Costa A, Pereira C, Freire F, Junqueira J, Jorge A. Antifungal activity of glycolics extracts of *Rosmarinus officinalis* Linn. And Syzygium cumini Linn. on clinical strains of Candida albicans, Candida glabrata and Candida tropicalis. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(2): 111-116.

18. Ardila M, Vargas A, Pérez J, Mejía L. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de allium sativum, coriandrum sativum, Eugenia caryophyllata, origanum vulgare, rosmarinas officinalis y thymus vulgaris frente a clostridium perfringens. Biosalud. 2009 ene/dic; 8: 47-57.

19. Barni M, Fontanals A, Moreno S. Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. contra Staphylococcus aureus 79 en dos modelos de infección en piel de ratón. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2009 mayo; 8 (3): 219-233.

20. Alves PM, Pereira JV, Higino JS, Pereira MSV, Queiroz LMG. Atividade antimicrobiana e antiaderente In Vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. Arquivos em Odontologia 2008 Abril/Junio; 44 (02): 53- 58. Lezcano I, Perez Rey R, Gutierrez MS, Baluja C, Sanchez E. Ozone inactivation of microorganisms in water. Gram positive bacteria and yeast. Ozone : science & engineering 2001;23(2:183-187.)

21. Hernández, C., Bataller, M., Aquino, A., Gutiérrez, Mirza., Pérez, C., Veliz, E., Vicente, C., Baluja, C., Álvarez, C. (2007) Cuba

High Quality Water Production for Pharmaceutical Use by Ozone Treatment. Water Treatment Laboratory, Ozone Research Center. National Center for Scientific Research, * Group of Technological Development. Ozone Research Center ** Laboratory of Microbiology. Ozone Research Center 15th Ave and 230 St., Siboney, Playa, Havana Cuba

22. Jaime Gallejos G, Muñoz S., Gaviria J.d, Sernan I.S 2007 Uso del osono en diferentes campos de la odontología Revista CESOdontologia 20(2):65-68
23. Clavo B, Pérez JL, López L, Suárez G, Lloret G, Rodriguez G, et al. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. J Altern Complement Med. 2003; 9:251-6.
24. Arano JM, Ilzarbe LM. Propuesta experimental para el mantenimiento en Periodoncia mediante oxigenoterapia Gaceta Dental. Nov 2012
25. Camey, L. (2008). Evaluación comparativa del poder bactericida del *agua ozonizada* sobre bacterias tipo *Enterococcus faecalis*, para la desinfeccion de conductos radiculares(estudio invitro). Guatemala.
26. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and Root Caries. Primary Dental Care 2006; 13(1): 37-41
27. Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M, Kakinoki Y, Nishihara T. Microbicidal efficacy of ozonated water against Candida albicans adhering to acrylic denture plate. Oral Microbiol Immunol 2005: 20: 206–210.
28. Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A. PCNA- expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface alter extraoral

rising for decontamination. Dental Traumatology. 2002 Oct; 18(5):262-265

29. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Tereshita M. Antimicrobyal effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. Journal Endodontic. 2004 Nov; 30(11):778-781.

30. Hernández R, Gally M. Plantas medicinales. Colombia: editorial Pax México, 1981

31. Tovar O. Plantas medicinales del valle del Mantaro. Lima, Perú: concytrc, 2001.

32. Muñoz L. Estudio taxonómico, cronológico y autoecologico de las plantas medicinales españolas. 1ra ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 2002

33. Al-Sereiti M, Abu-Amer P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biololgy, 1999; 37(2): 124-30.

34. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12: 564-582.

35. Peyman S, Reza F. Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L., by hydrodistillation-head space solvent microextraction. Journal of Flavour and Fragance, 2007; 10(5): 1002-1007.

36. Arteche A, Vanaclocha B, Güenechea J. Fitoterapia 3ra ed. Vademécum de prescripción. Plantas medicinales. Barcelona: Masson; 1998.

37. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2da ed. Editorial Acribia. 2001.

38. Alzamora I, Morales I, Armas I, Fernandez G. Medicina Tradicional en el Peru: Actividad antimicrobiana In Vitro de los aceites esenciales extraidos de algunas plantas aromaticas. Rev Anales de la Fac Medicina Univ Nac Mayor de San Marcos. 2001; 62(2):156 – 161.

39. Beutelspacher, E. (2005). Diseño y construccion de un generador de ozono para aplicaciones de purificacion de agua. Cuernavaca, Mexico.

40. Trejo, M., Calleja, I., Nicolarewsky, E. (2005). Cicatrización alveolar post - extracción y sus potenciales complicaciones. E.E.UU.

41. Gamboa, F. (2005). Control microbiológico sobre streptecoccos mutans y su accion acidogenica. Colombia

42. Cruz Guerra OS, Menéndez Cepero, Martínez M.E. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. Rev Cubana Estomatol 1997;34(1).21 Cuba.

43. Mattassi R. 1980 Ozonoterapia. Editorial Médica Farmacéutica; p.90-3 España.

44. Ross A, Philip W, Holbrook P. Microbiología bucal y clínica. Primera Edición, México, Editorial Científica PLM, S.A. C.V., 1985.

45. Negroni M. Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica. ed. Buenos Aires – Argentina: Panamericana. 2009:225-245.

46. Liébana J. Microbiología oral. Interamericana, McGraw-Hill, 1995

47. Liébana J. Microbiología oral. 2da ed. Barcelona – España: Mc GRAW – HILL Interamericana. 2002: 515 - 523.

48. Nolte, W., Microbiología Odontológica. 4ta ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1996.

49. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología, editorial académica. Sandra Janeth Gutiérrez Prieto 1°edicion editorial pontificia universidad javeriana, 2006 379 paginas

50. Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca, George w. Burnett Henry w. Scherp, George S. Schuster, editorial Limusa México 1986, 942 paginas.

51. Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero, Rosa del Carmen rocha García, Patricia Lozano Zarain e Ignacio Martínez laguna. Benemérita universidad autónoma de Puebla México 2004 paginas128-142

52. Actividad cariogénica y su relación con la incidencia de caries. Revista ADM volumen LV, marzo-abril N° 2 paginas 81-85

53. Köhlner, W. 2007. The present state of species within the genera Streptococcus and Enterococcus. Int. J. Med. Microbiol. 297: 133-150.

54. Cobo Molinos, A., H. Abriouel, N. Ben Omar, R. Lucas López, A. Galvez. 2006. Detection of ebp (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. Int. J. Food Microbiol. 126: 123-126.

55. Malani, P.N., C.A. Kauffman, M.J. Zervos. 2002. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment, pp. 385-408. In M.S. Gilmore (ed.), The Enterococci. Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. ASM Press, Washington, DC.

56. kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15 3 08-320

57. Caso A, Hung LK, Beirne OR. Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99: 2.

58. Ragno JR, Szkutnik AJ. Evaluation of 0.12% chlorhexidine rinse on the prevention of alveolar osteitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 72:524-526.

59. Sacsaquispe C, Velásquez, P 2002 Instituto de InvestigaciónManual De Procedimientos Para La Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana Por El Método De Disco Difusión Serie De Normas Técnicas N° 30 Lima - Peru

60. BARON, Luz, ROMERO-VECCHIONE, Eduardo, LOPEZ, Flor et al. Efecto Sinergico Antioxidante De Las Vitaminas E y C sobre La Lipoproteina De Baja Densidad En Fumadores y No Fumadores. ACV. [online]. 2004, vol.55, no.1 [citado 23 mayo de 2009], p.62-73.

ANEXOS

Figura 5. *Rosmarinus officinalis* “romero”.

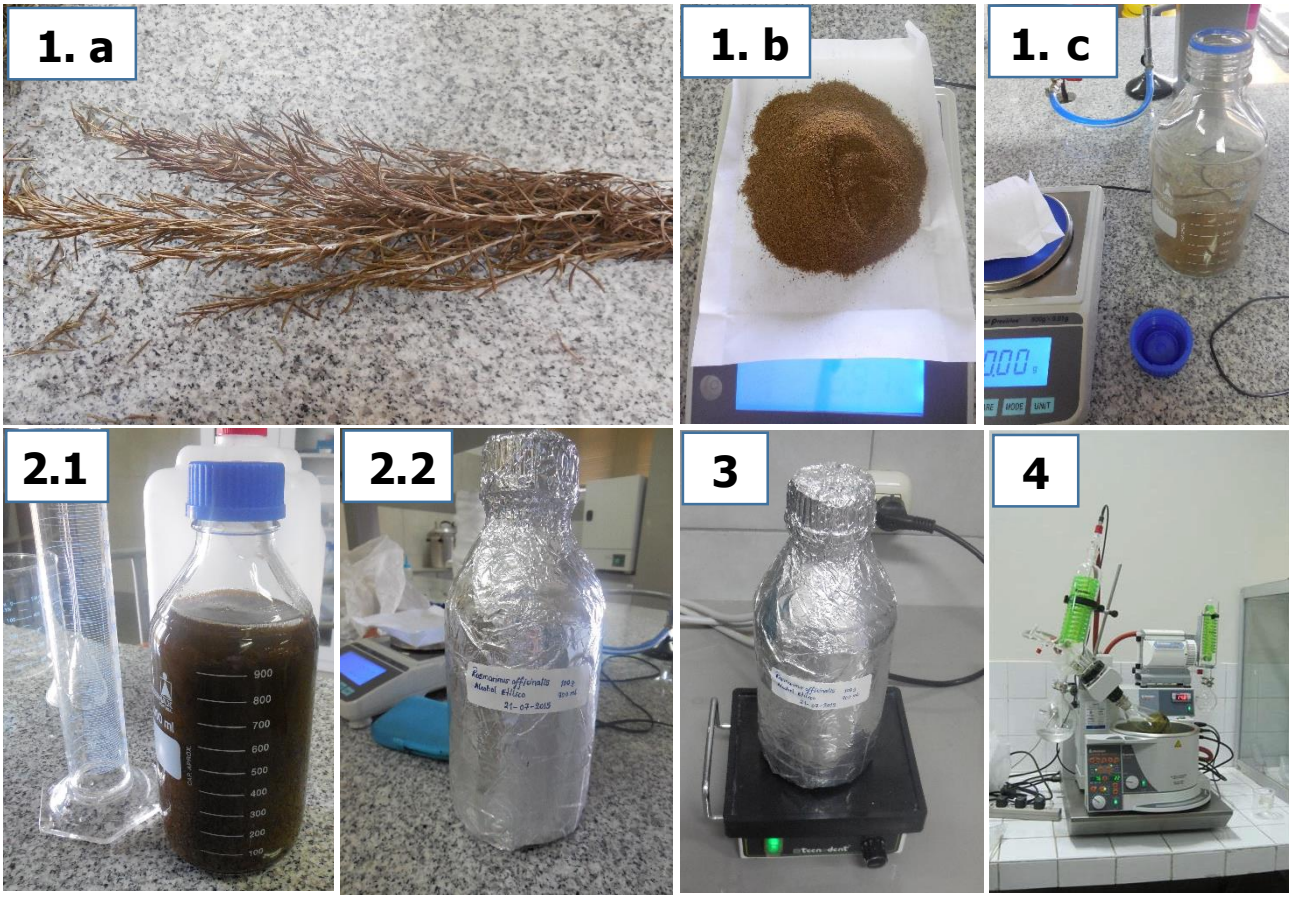

Figura 6. Proceso de obtención de extracto etanólico de hojas de *Rosmarinus officinalis "romero".*

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.

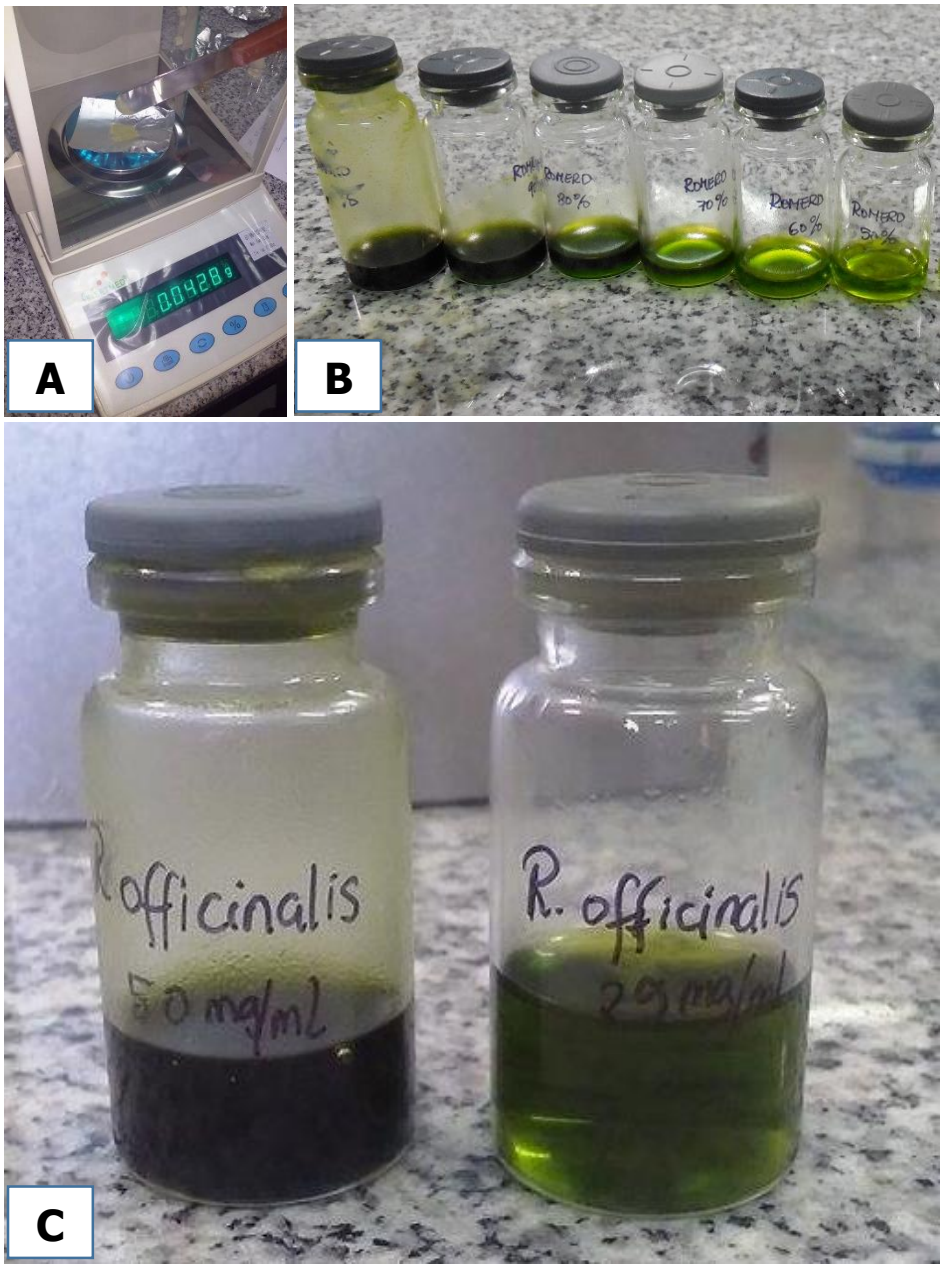

Figura 7. Proceso de obtención de las concentraciones del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*.

A. Pesado del extracto seco. B y C. Extracto de *R. officinalis* a diferentes concentraciones.

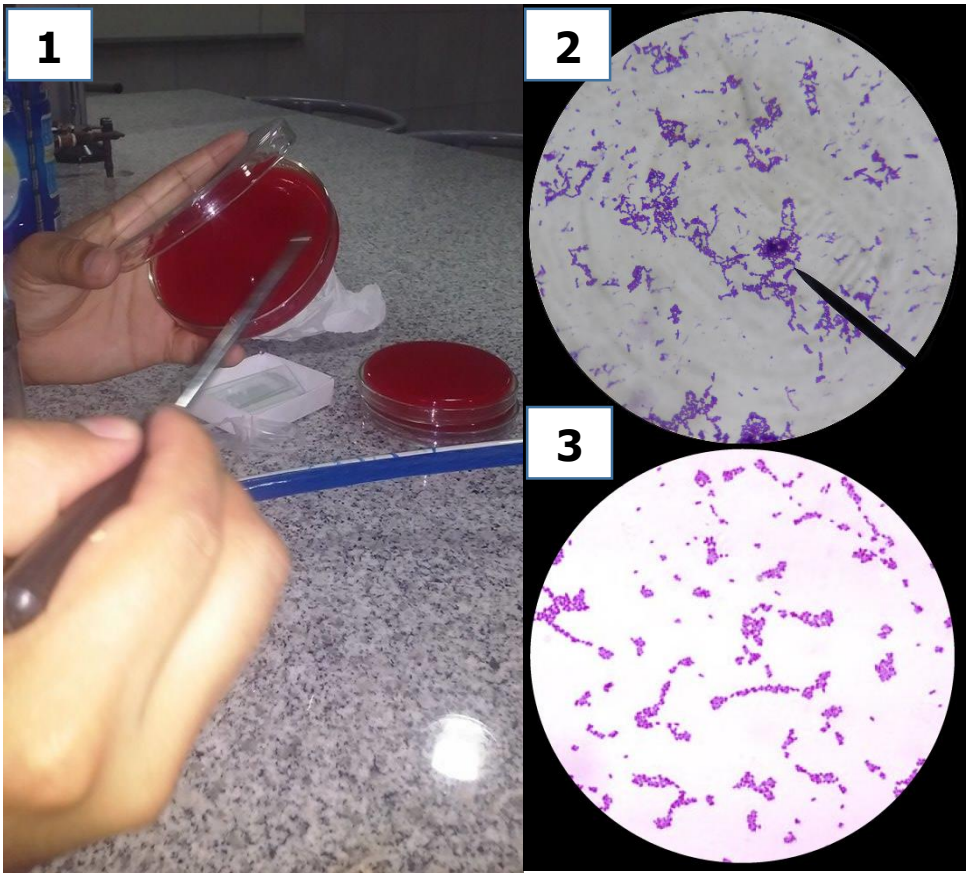

Figura 8. Proceso de reactivación de las cepas de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en placas con agar sangre.

1. Siembra en agar sangre.
2. Observación microscópica de *Streptococcus mutans*.
3. Observación microscópica de *Enterococcus faecalis*.

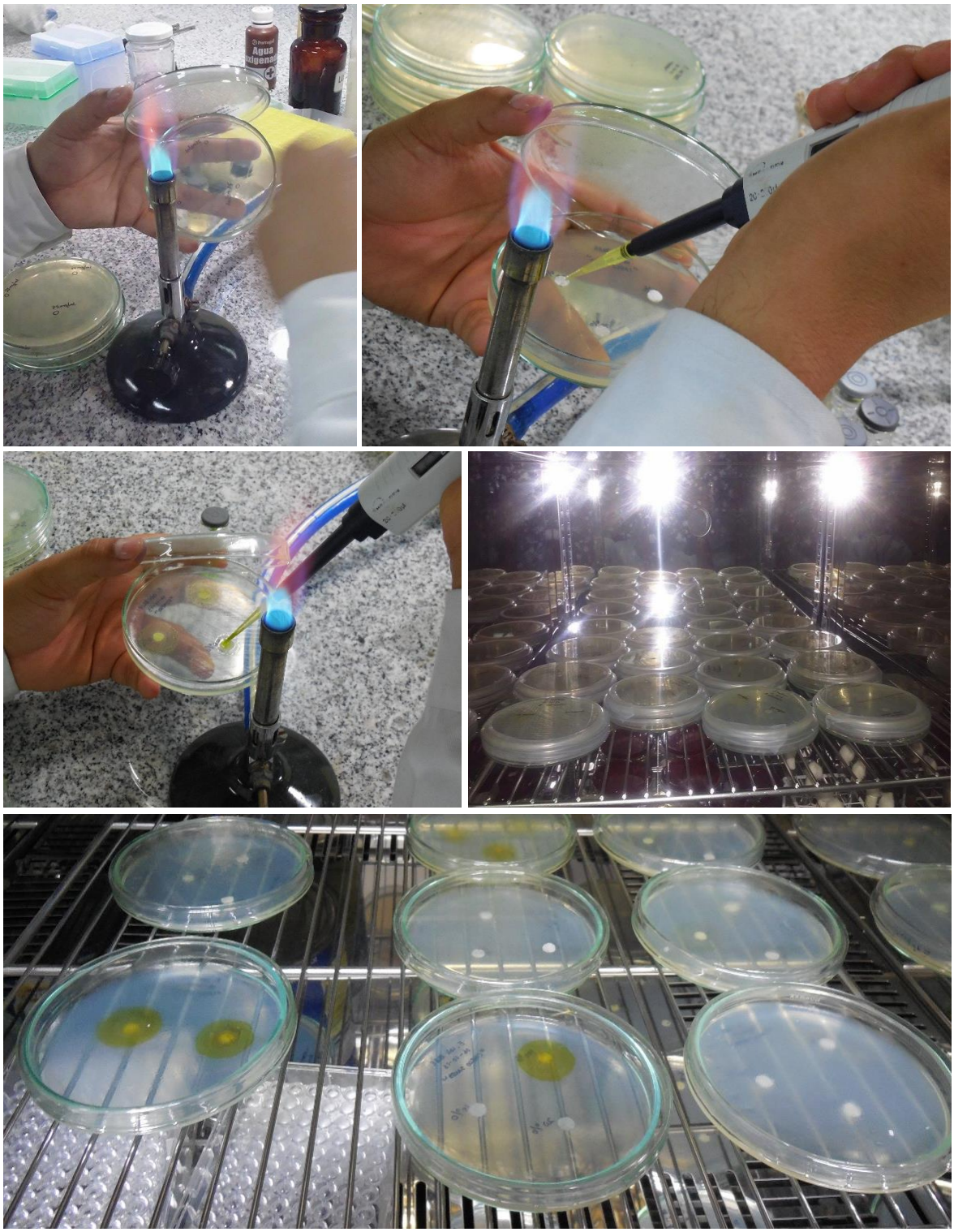

Figura 9. Proceso de sembrado de placas, colocación de discos y aplicación del extracto de *R. officinalis* e incubación de las placas.

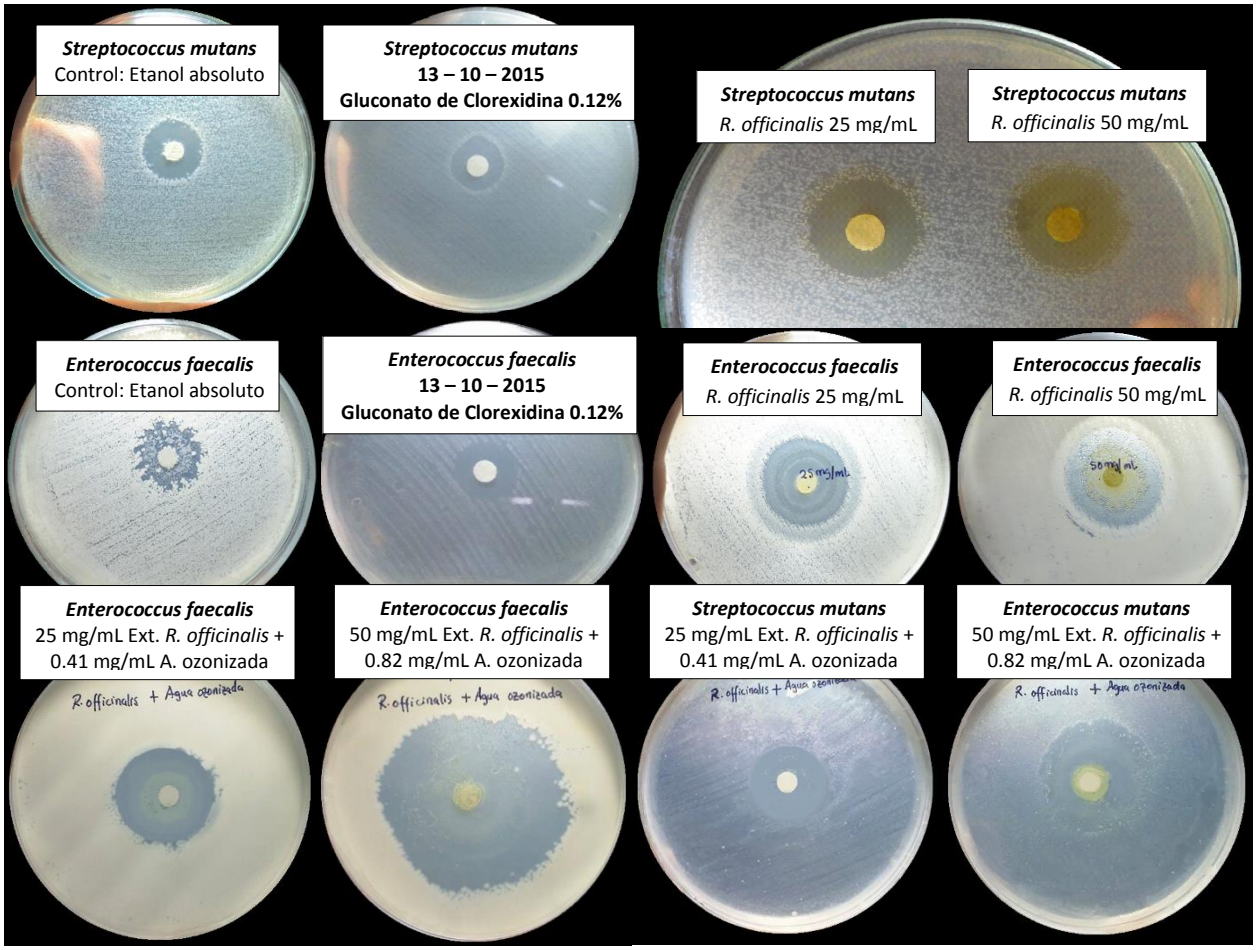

Figura 10. Halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* a concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*, de Etanol absoluto y del *gold standard* Gluconato de Clorhexidina 0,12% así como de la sinergia de esto mediante el Método de difusión en disco de papel de filtro.

Tabla 3. Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 25 mg/mL extracto alcohólico de *R. officinalis* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

Ensayos / Evaluaciones	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**	**ΣTi**	**Yi**
Etanol absoluto	15.5	16.2	15.3	15.5	62.5	15.5
Gluconato de clorhexidina 0.12 %	16.4	16.1	16.2	15.9	64.6	16.15
Streptococcus mutans	20.6	19.6	21	21.8	83	20.87
Enterococcus faecalis	26.7	26.8	27.2	28.2	108.9	27.12
ΣBi	79.2	78.7	79.7	81.4	319	
Σbi	19.8	19.675	19.925	20.35		19.91

Suma cuadrados totales	351.3696	
Suma de cuadrados del bloque	86.4914	345.9656
Suma de cuadrados del tratamiento	0.26115	1.0446
Suma de cuadrados del error experimental	4.3594	
Cuadrado Medio del tratamiento	0.08705	
Cuadrado medio del error experimental	0.484377778	
Cuadrado medio del bloque	115.3218667	

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**g.l**	**Cuadrado medio**	**Fw**
Tratamiento	1.0446	3	0.08705	0.179715098
Error	4.3594	1	0.484377778	
Total	5.404	4		

0,05

F_t = F (3, 9) = 3.86

Considerando qué:
Ho: Si Fw < Ft No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.
Ha: Si Fw > Ft Existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Por lo que al menos un tratamiento es diferente.

Interpretación:
Si $F_w < F_t$: se acepta H_o
Si $F_w > F_t$: se rechaza H_o y se acepta H_a.
Como F_w (0.263) < F_t (3.86), se acepta H_o y se rechaza H_a.

Comparación	(Yi-Yj)	DMS	Significancia
U1-U2	0.65	1.56	no
U1-U3	5.37	1.56	Si
U1-U4	11.62	1.56	Si
U2-U3	4.72	1.56	Si
U2-U4	10.97	1.56	Si
U3-U4	6.25	1.56	Si

Tabla 4. Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 50 mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

Ensayos y Evaluaciones	E1	E2	E3	E4	ΣTi	Yi
Etanol absoluto	15.5	16	15	15.5	62	15.5
Gluconato de clorhexidina 0.12 %	16.4	16	16.2	16	64.6	16.15
Streptococcus mutans	25.5	26	25	25.4	101.9	25.475
Enterococcus faecalis	32.7	33	32.5	33.1	131.3	32.825
ΣBi	90.1	91	88.7	90	359.8	
Σbi	22.525	22.75	22.175	22.5		22.4875

Suma cuadrados totales	820.4575	
Suma de cuadrados del bloque	204.778125	819.1125
Suma de cuadrados del tratamiento	0.168125	0.6725
Suma de cuadrados del error experimental	0.6725	
Cuadrado Medio del tratamiento	0.056041667	
Cuadrado medio del error experimental	0.074722222	
Cuadrado medio del bloque	273.0375	

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	Fw
Tratamiento	0.6725	3	0.056041667	0.75
Error	0.6725	1	0.074722222	
Total	1.345	4		

0,05

F_t = F (3, 9) = 3.86

Considerando qué:

Ho: Si Fw < Ft No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Ha: Si Fw > Ft Existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Por lo que al menos un tratamiento es diferente.

Interpretación:

Si $F_w < F_t$: se acepta H_o

Si $F_w > F_t$: se rechaza H_o y se acepta H_a.

Como F_w (0.75) < F_t (3.86), se acepta H_o y se rechaza H_a.

Comparación	(Yi-Yj)	DMS	Significancia
U1-U2	0.65	0.61	no
U1-U3	9.97	0.61	Si
U1-U4	17.32	0.61	Si
U2-U3	8.32	0.61	Si
U2-U4	16.67	0.61	Si
U3-U4	8.35	0.61	Si

Tabla 5. Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 0.41 mg/ml del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

Ensayos Evaluaciones	E1	E2	E3	E4	ΣTi	Yi
Agua destilada estéril	0	0	0	0	0	0
Gluconato de clorhexidina 0.12 %	16.4	16	16.2	16	64.6	16.15
Streptococcus mutans	8.5	8	8.3	8.5	33.3	8.325
Enterococcus faecalis	8	8.1	7.9	8	32	8
ΣBi	32.9	32.1	32.4	32.5	129.9	
Σbi	8.225	8.025	8.1	8.125		8.11875

Suma cuadrados totales	522.184375	
Suma de cuadrados del bloque	130.4717188	521.886875
Suma de cuadrados del tratamiento	0.02046875	0.081875
Suma de cuadrados del error experimental	0.215625	
Cuadrado Medio del tratamiento	0.006822917	
Cuadrado medio del error experimental	0.023958333	
Cuadrado medio del bloque	173.9622917	

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	Fw
Tratamiento	0.081875	3	0.006822917	0.284782609
Error	0.215625	1	0.023958333	
Total	0.2975	4		

0,05

F_t = F (3, 9) = 3.86

Considerando qué:

Ho: Si Fw < Ft No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Ha: Si Fw > Ft Existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Por lo que al menos un tratamiento es diferente.

Interpretación:

Si $F_w < F_t$: se acepta H_o

Si $F_w > F_t$: se rechaza H_o y se acepta H_a.

Como F_w (0.284) < F_t (3.86), se acepta H_o y se rechaza H_a.

Comparacion	(Yi-Yj)	DMS	Significancia
U1-U2	16.15	0.34	Si
U1-U3	8.32	0.34	Si
U1-U4	8	0.34	Si
U2-U3	7.83	0.34	Si
U2-U4	8.15	0.34	Si
U3-U4	0.32	0.34	no

Tabla 6. Análisis de varianza y determinación de la mínima diferencia significativa de los promedios del diámetro de halos de inhibición de la concentración de 0.82 mg/ml del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis.*

Ensayos Evaluaciones	E1	E2	E3	E4	ΣTi	Yi
Agua destilada estéril	0	0	0	0	0	0
Gluconato de clorhexidina 0.12 %	16.4	16	16.2	16	64.6	16.15
Streptococcus mutans	9.1	9	8.9	9	36	9
Enterococcus faecalis	9	9	8.9	8.8	35.7	8.925
ΣBi	34.5	34	34	33.8	136.3	
Σbi	8.625	8.5	8.5	8.45		8.51875

Suma cuadrados totales	524.964375	
Suma de cuadrados del bloque	131.2017188	524.806875
Suma de cuadrados del tratamiento	0.01671875	0.066875
Suma de cuadrados del error experimental	0.090625	
Cuadrado Medio del tratamiento	0.005572917	
Cuadrado medio del error experimental	0.010069444	
Cuadrado medio del bloque	174.935625	

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	Fw
Tratamiento	0.066875	3	0.005572917	0.553448276
Error	0.090625	1	0.010069444	
Total	0.1575	4		

0,05

F_t = F (3, 9) = 3.86

Considerando qué:

Ho: Si Fw < Ft No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Ha: Si Fw > Ft Existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Por lo que al menos un tratamiento es diferente.

Interpretación:

Si $F_w < F_t$: se acepta H_o

Si $F_w > F_t$: se rechaza H_o y se acepta H_a.

Como F_w (0.553) < F_t (3.86), se acepta H_o y se rechaza H_a.

Comparación	(Yi-Yj)	DMS	Significancia
U1-U2	16.15	0.22	Si
U1-U3	9	0.22	Si
U1-U4	8.9	0.22	Si
U2-U3	7.15	0.22	Si
U2-U4	7.23	0.22	Si
U3-U4	0.08	0.22	no