

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EAP. DE ODONTOLOGÍA

**Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto
etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora
salival**

TESIS

para obtener el Título de Cirujano Dentista

AUTOR

Taylor Pitágoras Purca Peña

ASESOR

Hilda Moromi Nakata

Lima – Perú

2013

JURADO DE SUSTENTACIÓN

Presidente : Mg. C.D. Manuel Silva Infantes

Miembro : C.D. Jesús Julio Ochoa Tataje

Miembro Asesor : Mg. Blg^o Hilda Moromi Nakata

DEDICATORIA

A mis padres, **Epifanio y Graciela** por todo el inmenso amor, comprensión, esfuerzo y apoyo incondicional que me dieron para realizar todo lo que me he propuesto.

A mis hermanos, ejemplos de esfuerzo y dedicación, amigos que labraron mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Mg. Blg°. Hilda Moromi Nakata, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su permanente orientación científica, amistad y su incondicional apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Mg. C.D. Manuel Silva Infantes, docente del Dpto. de Cirugía Buco-Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su valiosa colaboración y orientación durante la ejecución del proyecto.

Al C.D. Jesús Julio Ochoa Tataje docente del Dpto. Rehabilitación Oral y Oclusión de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su orientación y apoyo en la elaboración de este trabajo.

A la Blg°. Elba Martínez Cadillo, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su valiosa colaboración y orientación durante la ejecución del proyecto.

Al Mg. Dr. Américo Castro Luna, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, por su desinteresada colaboración en la obtención del extracto etanólico del *Rosmarinus officinalis*.

Al personal técnico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Srta. Violeta Chavesta; por su constante apoyo en la realización del presente trabajo.

A todos mis profesores y amigos de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos que de una u otra manera me brindaron su apoyo e hicieron posible la realización de esta tesis.

ÍNDICE

I. INTRODUCCION.....	9
II. PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	11
2.1 Área problema.....	11
2.2 Delimitación del problema.....	12
2.3 Formulación del problema.....	13
2.4 Objetivos de investigación.....	14
2.4.1 Objetivo general.....	14
2.4.2 Objetivo específico.....	14
2.5 Justificación de la investigación.....	14
2.6 Limitación de la investigación.....	15
III. MARCO TEORICO.....	16
3.1 Antecedentes.....	16
3.2. BASES TEÓRICAS.....	23
3.2.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero).....	23
3.2.1.1 Historia.....	23
3.2.1.2 Taxonomía.....	23
3.2.1.3 Descripción botánica.....	24
3.2.1.4 Distribución geográfica.....	25
3.2.1.5 Hábitat.....	25
3.2.1.6 Composición química.....	25
3.2.1.7 Mecanismo de acción.....	28
3.2.1.8 Actividad farmacológica.....	29
3.2.1.9 Actividad antibacteriana.....	30
3.2.1.10 Usos y aplicaciones.....	30
3.2.1.11 Efectos secundarios y contraindicaciones.....	31
3.2.1.12 Uso del <i>Rosmarinus officinalis</i> en odontología.....	32

3.2.1.13 El <i>Rosmarinus officinalis</i> en el Perú.....	32
3.2.2 Clorhexidina.....	33
3.2.2.1 Historia.....	33
3.2.2.2 Estructura y características químicas.....	33
3.2.2.3 Mecanismo de acción.....	34
3.2.2.4 Farmacocinética.....	35
3.2.2.5 Concentraciones.....	35
3.2.2.6 Medios de presentación y formas comerciales.....	36
3.2.2.7 Indicaciones.....	36
3.2.2.8 Efectos secundarios.....	36
3.2.3 Ecología de cavidad bucal.....	36
3.2.3.1 Origen y desarrollo de la microbiota oral.....	37
3.2.3.2 Sistema inmune de cavidad bucal.....	39
3.2.3.3 Factores que alteran el desarrollo de la flora bucal.....	40
3.2.3.4 Flora Microbiana en la Cavidad Oral.....	43
3.2.3.5 Saliva.....	45
3.2.3.5.1 Definición.....	45
3.2.3.5.2 Componentes.....	45
3.2.3.5.3 Tipos de la saliva.....	46
3.2.3.5.4 Funciones de la saliva.....	47
3.2.3.5.5 Flora microbiana.....	49
3.3 Definición de términos básicos.....	51
3.4 Hipótesis y variables.....	52
3.5 Operacionalización de variables.....	53
IV. METODOLOGIA.....	54
4.1 Tipo de investigación.....	54
4.2 Población y muestra.....	54

4.3 Recursos y materiales.....	55
4.4 Procedimiento y técnica.....	58
4.5 Procesamiento de datos.....	61
4.6 Análisis de resultado.....	62
V. RESULTADOS.....	63
VI. DISCUSION.....	68
VII. CONCLUSIONES.....	72
VIII. RECOMENDACIONES.....	73
IX. RESUMEN.....	74
X. BIBLIOGRADFIA.....	76
XI. ANEXOS.....	83

LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS:

Cuadro N° 01: Funciones y componentes de la saliva.....	49
Cuadro N° 02: Distribución aproximada de microorganismo en la saliva.....	50
Cuadro N° 03: Halos de inhibición del efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de EERO sobre flora salival.....	64
Cuadro N° 04: Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EERO de 25 mg/ml y las soluciones de control.....	65
Cuadro N° 05: Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EERO de 50 mg/ml y las soluciones de control.....	66
Cuadro N° 06: Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EERO de 75 mg/ml y las soluciones de control.....	67
Gráfico N° 01: Compuestos químicos presentes en <i>R. officinalis</i>	26
Gráfico N°02: Promedio del halo de Inhibición del efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de EERO sobre flora salival.....	63
Fotografías	89

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas durante miles de años en muchas partes del mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales; y aunque su empleo con fines terapéuticos estuvo durante muchos años asociado a ritos mágicos y religiosos, habría que resaltar que esta utilización se basa en el conocimiento de la planta. El origen de la utilización de las esencias y aromas es tan antiguo como la agricultura. Comenzó por una recogida indiferente de plantas, pasando a una recolección selectiva de unas sobre otras, hasta llegar a domesticar las más útiles hasta su extensión a cultivo. Se aprovechan en la industria alimentaria, en el hogar, en medicina y en cosméticos. 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.

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.

El *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. 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. Por ello, este estudio tiene como objetivo determinar la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de romero sobre flora salival.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 ÁREA PROBLEMA

Las plantas medicinales fueron los primeros medicamentos que conoció el hombre. Con ellas curó sus enfermedades, calmó sus dolores, mitigó sus penas, angustias y preocupaciones, se alucinó, se intoxicó y hasta provocó su muerte.¹ Las plantas son importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos que constituyen modelos y materia prima para la síntesis de productos farmacéuticos.² También se consideran como recursos terapéuticos para el tratamiento y mantenimiento de la salud, como medicina popular, sobre todo en los países subdesarrollados.³ El uso de la medicina herbaria tiene una gran importancia socioeconómica en comunidades de bajos ingresos, debido a su alta disponibilidad, baja toxicidad, riesgo mínimo de efectos secundarios y el bajo costo.⁴

Según la Organización Mundial de la Salud, el 80 % de la población de los países en desarrollo lo utilizan en las prácticas tradicionales en la atención primaria de salud con el fin de tratar y curar sus enfermedades⁵

El Perú tiene una gran variedad de especies de plantas en su flora, sin embargo, la producción científica médica relacionada con las publicaciones y las propiedades de las plantas medicinales son escasas, por lo cual, es menester contribuir con el conocimiento y difusión de sus diferentes usos en la medicina.^{6, 7}

El *Rosmarinus officinalis* (romero) pertenece a la familia Labiatae (Labiadas) y crece en la costa mediterránea rocosa y arenosa. Se aclimataron en el Perú y se cultiva en la costa, sierra y selva hasta 3.500 metros de altura sobre el nivel del mar. Entre las características clave se citan: hojas lineares, coriáceas, de color verde, tubulares y fuerte agradable aroma es un arbusto perenne de tamaño 1,50 m. Usado

por la población con fines medicinales, se ingiere como té, las hojas y los tallos es parte de la comida de muchas naciones con el fin de obtener energía.⁸⁻¹¹ Posee propiedades: antiespasmódico, antiinflamatorio, antiséptico, anti fúngico y antibacteriano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.⁹ Los estudios realizados hasta ahora muestran el potencial de inhibición del crecimiento bacteriano y la síntesis de glucano, lo que sugiere su uso como coadyuvante en el medio de control de las bacterias cariogénicas.¹² Estudios *in vitro* demostraron que el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) tiene una acción de inhibición bacteriana.¹³

2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad a nivel mundial las plantas son utilizadas en la medicina general, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades. Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de biólogos, químicos y farmacólogos.¹⁴ El Perú, considerado uno de los países megadiversos del planeta, ha efectuado importantes aportes de especies y variedades para el mundo gracias a los diversos pisos ecológicos y microclimas que presenta.¹⁵

El *Rosmarinus officinalis* (romero), es una planta que crece en todas partes del mundo, a nivel de América del Sur crece en varios países, en el Perú crece en la costa, sierra y selva.¹¹ Del (romero) se utilizan sobre todo las hojas y las flores. Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de romero, que se utiliza para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias. Se utiliza en fricciones como estimulante del cuero cabelludo (alopecia). La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el hígado. El humo de

romero sirve como tratamiento para el asma. El alcanfor de romero tiene efecto hipertensor (sube la tensión) y tonifica la circulación sanguínea. Por sus propiedades antisépticas, se puede aplicar por decocción sobre llagas y heridas como cicatrizante. En la cocina se utiliza para asados, guisos, sopas y salsas y además se puede preparar "vino de romero" con propiedades benéficas para la función estomacal así como en la fabricación de jabones, desodorantes, cosméticos, perfumes, etc.^{1, 11}

En investigaciones realizadas "*in vitro*" con extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) se ha demostrado que tiene actividades bactericidas y bacteriostáticas a concentraciones bajas contra los *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*,¹⁶⁻¹⁸ actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*.¹⁹ También mostró potencial antimicótico para todas las cepas de *Candida albicans*, y las cepas de *C. tropicalis*.²⁰

Por las consideraciones anteriormente expuestas, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto antibacteriano "*in vitro*" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre la flora salival.

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Puesto que se ha demostrado por medio de otros estudios científicos que las plantas medicinales poseen propiedades terapéuticas sobre la caries dental y la enfermedad periodontal, que son las enfermedades que más prevalecen en la cavidad oral, se realiza el presente trabajo de investigación con la finalidad de comprobar las propiedades antibacterianas del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a flora salival. Así, se plantea la siguiente formulación del problema:

¿Cuál será el efecto antibacteriano "*in vitro*" de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival?

2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.4.1 Objetivo general

- ❖ Determinar el efecto antibacteriano “*in vitro*” de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival.

2.4.4 Objetivos específicos

- ❖ Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a la concentración de 25 mg/ml sobre flora salival.
- ❖ Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a la concentración de 50 mg/ml sobre flora salival.
- ❖ Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a la concentración de 75 mg/ml sobre flora salival.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos por medición de halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) en diferentes concentraciones y la clorhexidina al 0, 12 % sobre flora salival.

2.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La medicina natural aunque ha sido utilizada como tratamiento médico general desde tiempos inmemoriales, es muy poco conocida como posible aporte al campo Odontológico. Al respecto, existen investigaciones del comportamiento de ciertos compuestos de origen vegetal sobre flora salival. La importancia del presente estudio radica en el posible uso del *Rosmarinus officinalis* en higiene oral con el fin de comprobar su efectividad antimicrobiana, así mismo, basándose en estudios anteriores sobre sus efectos antibacterianos en micro biota oral,¹⁶⁻²⁰ por lo que se plantea la

preparación de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* para verificar que tiene efecto antibacteriano sobre flora salival.

Al final de este trabajo de investigación se busca contribuir con el conocimiento y difusión del *Rosmarinus officinalis* y utilizarlas en el Perú como alternativa terapéutica en el campo odontológico, por sus beneficios terapéuticos y bajo costo que lo haría accesible a las clases más necesitadas.

En el presente estudio se comprobará la efectividad antibacteriana del *Rosmarinus officinalis* sobre la flora salival. De ser así, representaría una alternativa más, para la prevención de enfermedades bucales, que tendría un valor económico reducido y que por ser natural ocasionaría poco o ningún daño a nuestro organismo.

2.6 LIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Escaso material bibliográfico en el Perú de investigaciones relacionadas directamente a evaluar la actividad antibacteriana de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

ABREU M. y col. (2012). Evaluaron “*in vitro*” las actividades bacteriostáticas y bactericidas de tinturas de *Rosmarinus officinalis* (romero), *Calendula officinalis* (Maravilla) y *Mikania glomerata* (Guaco) y compararon con la clorhexidina al 0.12 %; frente a cepas bacterianas estandarizadas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. La concentración mínima Inhibitoria (MIC) se determinó por la técnica de microdilución, se utilizaron tinturas de *Rosmarinus officinalis* en concentraciones que varían entre 100 y 0,78 mg/ml y como control positivo clorhexidina al 0,12 %. La lectura se realizó después de 24 horas por el método visual comprobando que las tinturas de romero mostraron actividades bactericidas y bacteriostáticas a una (MIC) de 0,78 mg/ml; contra los *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de clorhexidina fue superior a las tinturas.¹⁶

TEIXEIRA I. (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.¹⁷

DALIRSANI Z. y col. (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, las bacterias de *Streptococcus mutans* se cultivó en agar sangre. Después de 24 h los diámetros de los halos 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.¹⁸

ESTRADA S. (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 ug/ml, frente a las distintas bacterias y la 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.¹⁹

CASTRO R. y col. (2010). Evaluaron “*in vitro*” la actividad anti fúngica 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

Sabouraud, fueron incubados a 35 °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.²⁰

BATTAGIN J. (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 acuoso de *Rosmarinus officinalis* (romero) fueron prometedores, ya que mostraron una inhibición significativa de la actividad de GTF (50 – 75 %) en concentraciones superiores a 4 mg/ml.²¹

VOLCAO L. y col. (2010). Determinaron "in vitro" la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) contra tres cepas bacterianas estandarizadas: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *aerogenes Entorobacter*. 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.²²

CASTAÑO H. y col. (2010). Evaluaron "in vitro" la actividad bactericida del extracto etanólico y el aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis*. Sobre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona*

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.²³

MONROY A. y col. (2009). Evaluaron “*in vitro*” la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* y chile ancho contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*. La concentración mínima inhibitoria (CIM) se determinó mediante la técnica de microdilución. Las concentraciones que se utilizaron para ambos extractos fueron de 0.6 a 1.4 mg/ml; los resultados de la evaluación de ambos extractos inhibieron el crecimiento de los microorganismos patógenos en rangos que van de 0.8 - 1.2 mg/ml, la (CIM) para el romero fue 1.2 mg/ml.²⁴

COSTA A. y col. (2009). En un estudio evaluaron “*in vitro*” el potencial anti fúngico de extractos glicolicos 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 glicolicos 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*.²⁵

ARDILA M. y col. (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 ug/ml. Contra *Clostridium perfringens*; el extracto de romero fue disuelto en una solución de hexano-acetona que presento una inhibición de

14,4 mm. De diámetro en el crecimiento bacteriano, casi semejante a la vancomicina 14.5 mm. Que fue utilizado como control positivo.²⁶

BARNI M. y col. (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.²⁷

ROZMAN T. y col. (2009). Estudiaron la actividad antimicrobiana del extracto de romero con una concentración variable de ácido carnósico, en dicho estudio se utilizaron dos métodos: el de difusión en disco y el crecimiento en caldo en contra de las distintas especies de *Listeria* y en contra de diferentes cepas de *L. monocytogenes*, dicho experimento demostró una eficacia al inhibir el crecimiento de la *L. monocytogenes*.²⁸

SILVA M. y col. (2008). Determinaron la actividad antimicrobiana y antiadherente “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a diluciones que varían de: 1:1 a 1:512 y clorhexidina al 0,12 %, contra cepas estandarizadas de: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* y *Lactobacillus casei*; los resultados demostraron que todas las cepas fueron sensibles al extracto de romero, excepto *Streptococcus mitis*. Los halos de inhibición formados varían de 11 a 18 mm. En las diluciones que van de 1:1 a 1:4; mientras que con la clorhexidina al 0,12 % halos de inhibición fueron de 10 a 24 mm. En diluciones

que van de 1:1 a 1:64; además se observó que el romero presenta una actividad antiadherente hasta una concentración que va desde 1:1 a 1:18, mientras que la clorhexidina al 0.12 % llega hasta 1: 32 de actividad antiadherencia.¹²

ALVES M. (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.¹³

HENTZ S. y col. (2007). En un estudio “*in vitro*” evaluaron la actividad antimicrobiana de aceite esencial del *Rosmarinus officinalis*. Contra *Salmonella sp* utilizaron el método del disco de papel de filtro para evaluar la inhibición de la acción del aceite esencial de romero. Los resultados mostraron que la inhibición del aceite esencial de *R. officinalis* puro al 100 % contra *Salmonella sp*, fue menor que la inhibición del antibiótico (sulfametoxazol) utilizado como control positivo. Concluyeron que el aceite esencial de romero inhibe el crecimiento de la *Salmonella sp*.²⁹

GENENA K. y col. (2007). Obtuvieron extracto de hoja de romero con la técnica de fluidos supercríticos (SFE). Los extractos se analizaron y se comprobó su actividad contra bacterias Gram positivas: *S. aureus*, y *B. cereus*, y bacterias Gram negativas: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y antifúngica: *Candida albicans*.³⁰

GONTIJO C. y col. (2006). Realizaron un estudio “*in vitro*” que tuvo como objetivo desarrollar un enjuague bucal que contiene la combinación de extractos hidroalcohólicos de *Rosmarinus officinalis*, *Plantago importante*, *impetiginosa*

Tabebuia, *Achillea millefolium* y *Nasturtium officinale*, para evaluar su composición farmacológica y su actividad antibacteriana frente a cepas estándares de Gram-positivas y Gram-negativas: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. fecalis*. La actividad antibacteriana se observó usando los métodos de disco de papel por difusión, la concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó por el Método de microdilución sucesiva. Los resultados obtenidos mostraron que todas las bacterias fueron inhibidas por los extractos.³¹

RAU U. y col. (2006). Reportaron la actividad antimicrobiana y citotoxicidad del α -pineno, 1,8 cineol, canfeno, β -mirceno, alcanfor y borneol, contenidos en el aceite de romero; demostraron un efecto moderado con el grupo de las Gram positivas y Gram negativas, en dicho estudio se utilizó una concentración de 5 mg/ml, lo que inhibió completamente la germinación de *Triticum vulgare* y afectó a la membrana celular de las bacterias lo que redujo la mitosis de las bacterias.³²

3.2. BASES TEÓRICAS

3.2.1 *Rosmarinus officinalis* (romero)

3.2.1.1 Historia

El romero (*R. officinalis*) es una planta mediterránea cuyo término se deriva del griego “rhops y myrinos” que significa “arbusto marino” por su crecimiento cercano a las costas. El epíteto "*officinalis*" se aplica a muchas especies que se usan en las oficinas o farmacias y también a aquellas plantas que son consideradas medicinales.^{33,34}

El romero es conocido desde el antiguo Egipto, se dice que los faraones egipcios hacían poner sobre sus tumbas un ramillete de romero para perfumar su viaje al país de los muertos. Sus virtudes medicinales ya fueron reconocidas por Dioscórides en los capítulos 81, 82 y 83 del Libro III, en los que habla del libanotis coronaria: el romero. Su aceite esencial fue obtenido por primera vez hacia el año 1330 por Ramón Llull y desde entonces, se emplea en perfumería. En el siglo XVI la reina Isabel de Hungría lo utilizó para tratar el reumatismo que padecía convirtiéndose en «el agua de la reina de Hungría», en uno de los remedios más famosos de la corte de Luis XIV. Los boticarios empleaban el romero en gran número de preparados pero en la actualidad sólo el aceite esencial está incluido en las farmacopeas.¹

3.2.1.2 Taxonomía

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*.

Taxonomía^{35,36}

Reino: *PLANTAE*

División: *MAGNOLIOPHYTA*

Clase: *MAGNOLIOPSIDA*

Orden: *LAMIALES*

Familia: *LAMIACEAE*

Género: *Rosmarinus*

Especie: *Rosmarinus officinalis*

Nombre común: (romero)

3.2.1.3 Descripción botánica

El romero es un arbusto leñoso de hojas perennes muy ramificado, puede llegar a medir 2 metros de altura. Lo encontramos de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos y tallos añosos de color rojizo con la corteza resquebrajada.^{1,11}

Las hojas, pequeñas y muy abundantes, presentan forma linear. Son opuestas, sésiles, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vellosidad. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos.^{1,11}

Las flores son de unos 5 mm de largo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente. Florece a comienzos de primavera, aunque pueden encontrarse flores prácticamente durante todo el año.^{11,34}

El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco.^{10,33,34}

3.2.1.4 Distribución geográfica

El romero, es una planta que crece en todas partes del mundo se distribuye desde la región mediterránea, sur de Europa, norte de África. Incluso se encuentra también en Asia Menor y Sudamérica. En España se halla en la mayor parte de Cataluña, hasta los Pirineos en Aragón y Navarra, Castilla-La Mancha, Castilla y León, La Rioja, Madrid, Murcia, Extremadura, en las zonas montañosas de la Comunidad Valenciana, Andalucía e islas Baleares, en Centroamérica y el Caribe, a nivel de américa del sur crece en varios países, en el Perú crece en la costa, sierra y selva.^{1,11,34}

3.2.1.5 Hábitat

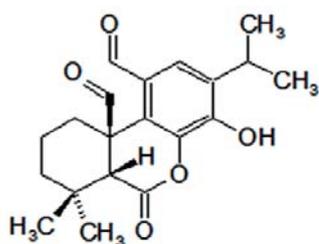
Este arbusto se desarrolla en climas tropicales, subtropicales y húmedos, y en suelos áridos, secos, ligeros, algo arenosos, muy permeables, bien drenados, calcáreos o pobres, pero no se adapta a las tierras arcillosas compactas. En el Perú crece en la costa, sierra y selva hasta los 3,500 msnm, formando parte del sotobosque, en laderas de tierras bajas y en lugares secos.^{37,38}

3.2.1.6 Composición química

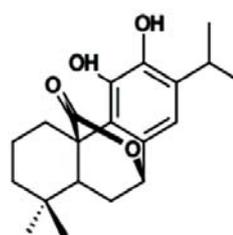
En la planta se han reportado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. El aceite esencial de romero es el componente más estudiado cualitativamente, algunas de las principales estructuras químicas activas se muestran en la Figura 1. Diferentes trabajos de investigación afirman que dependiendo del lugar geográfico donde crezcan

las plantas bajo condiciones de tipo de suelo, clima y altura sobre el nivel del mar generan diferentes cambios en cantidad y tipos de moléculas bioactivas presentes.^{39,40}

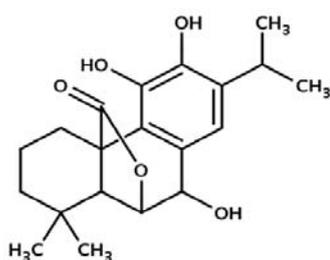
De manera general, la composición química del aceite esencial de romero ha sido descrita en trabajos que indican el tipo de moléculas activas presentes. Se ha identificado la presencia de α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, 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.⁴¹



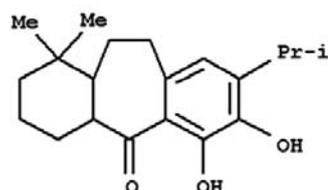
Acido carnósico



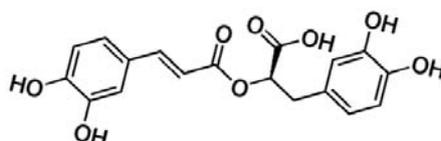
Carnosol



Epirosmanol



Rosmaridifenol



Acido rosmarínico

Gráfico N° 01: Compuestos químicos presentes en *R. officinalis*.

En el caso de las hojas del romero prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7- metil-epirosmanol.⁴²

Dentro de los compuestos activos con efecto antibacteriano útil, se mencionan los siguientes compuestos:

Terpenoides. Diterpenos (picrosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona), Triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3-acetil-ésteres). Son aquellos que tienen elementos adicionales, usualmente oxígeno; se especula que involucra la ruptura de la membrana celular por los compuestos lipofílicos.⁴¹

Fenólicos y polifenoles (ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico). Los sitios y números de grupo hidroxilo en el grupo fenol se cree que están relacionado con la toxicidad contra los microorganismos, efectivo contra virus, bacterias y hongos; se cree que produce una inhibición enzimática o una interacción no específica con las proteínas.⁴¹

Flavonas, flavonoides y flavonol. (cirsimarina, diosmina, hesperidina, homoplantiginina, fegopolina, nepetina y nepitrina), son sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas, forman un complejo con las proteínas solubles y extracelulares y el complejo de la pared de la célula bacteriana, impidiendo el desarrollo de las células bacterianas.⁴¹

Alcaloides. Constituyen un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas, tiene efecto antimicrobiano, viral: se le atribuye a su capacidad de intercalarse con el DNA.⁴¹

Taninos son compuestos polifenólicos, desempeñan en las plantas acción defensiva frente a insectos, son antidiarreico, antimicrobiana, inhibidora enzimática, están relacionadas con la capacidad de inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc.⁴¹

Aceites esenciales. Es un líquido volátil, insolubles en agua, con un ligero tinte entre amarillo y verdoso, de olor alcanforado y sabor amargo. Esta esencia está formada numerosas sustancias diferentes: Pineno, canfeno, cineol, alcanfor de romero 12 %, limonero, eucaliptol 20-32 %, borneol 18 %, actúan como anti-inflamatorios, expectorantes, diuréticas, antiespasmódicas y tónicas sobre el estómago, intestino, bilis y el hígado; también combaten agentes patógenos como: bacterias, hongos, virus.⁴¹

3.2.1.7 Mecanismo de acción

La actividad antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* es mayor contra las bacterias. Se sugiere que esta capacidad se debe a la acción de flavonoides, terpenoides, polifenoles, tanino y aceites esenciales, cuyo mecanismo de acción consiste en: degradar la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que conduce a una pérdida de iones de potasio, provocando autólisis de la célula, también aumenta la permeabilidad de la membrana, y disipa su potencial, haciendo que las bacterias pierdan su capacidad de motilidad, transporte de membrana y síntesis de ATP, haciéndolas más vulnerables al ataque inmunológico y potenciando a los antibióticos.^{39,43}

3.2.1.8 Actividad farmacológica

El romero es carminativo, digestivo y antiespasmódico, y tiene propiedades coleréticas, colagogas y hepatoprotectoras. El efecto favorable que ejerce en la digestión se produce al actuar sobre varios niveles. En primer lugar, estimula la producción de los jugos gastrointestinales. Además relaja el músculo liso gastrointestinal, elimina posibles espasmos y favorece las secreciones. Al relajar las cardias, tiene un efecto carminativo y colagogo, gracias a la relajación del esfínter de Oddi.⁴¹⁻⁴⁴

La planta ejerce también un efecto diurético, antiinflamatorio, antiulcerogénico y antioxidante. Aunque en la literatura científica no se han descrito ensayos clínicos sobre estas propiedades farmacológicas, sí que se han demostrado mediante ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*”. Su actividad colagoga, colerética y protectora hepática, así como su efecto diurético se ha observado en ratas y cobayos. Algunos ensayos farmacológicos han permitido asimismo demostrar que el aceite esencial, algunos extractos y varios de sus componentes aislados, relajan las musculaturas lisas traqueales, intestinales y vasculares de distintos animales de experimentación. Y aunque el mecanismo de acción no está del todo aclarado, algunos autores consideran que se debe a una acción antagonista del calcio, sobre todo en el caso de los efectos relajantes del aceite esencial sobre la musculatura lisa traqueal.^{10,11,45}

En cuanto a la actividad antiinflamatoria de los principios activos del romero, se ha comprobado en animales de experimentación que el ácido rosmarínico incrementa la producción de prostaglandina E2 y reduce la producción de leucotrieno B4 en leucocitos polimorfonucleares humanos. Asimismo se ha observado que este ácido fenólico inhibe el sistema del complemento. Por esta razón su uso podría ser útil en el tratamiento o la prevención de diversas afecciones inflamatorias. También se ha demostrado en ratas que el extracto hidroalcohólico de la planta tiene una actividad

anti ulcerosa, efecto que algunos investigadores atribuyen a los componentes antioxidantes que contiene.^{10,11,41}

3.2.1.9 Actividad antibacteriana

El extracto de hoja de *R. officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias, la actividad citotóxica afecta directamente a la fase mitótica de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por destacar, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*, estos microorganismos son susceptibles a los componentes del extracto de romero, en cuyo extracto prevalecen el ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnosólico y flavonoides.^{46,47} También se obtuvieron extracto de hoja de romero y se comprobó su actividad contra bacterias Gram positivas: *S. aureus*, y *B. cereus*, y bacterias Gram negativas: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y antifúngica: *Candida albicans*.^{16,17,20}

3.2.1.10 Usos y aplicaciones

Del romero se utilizan sobre todo las hojas y a veces, las flores. Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de romero, que se utiliza para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias. Se utiliza en fricciones como estimulante del cuero cabelludo (alopecia). La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el hígado y para atajar los espasmos intestinales. Debe tomarse antes o después de las comidas. El humo de romero sirve como tratamiento para el asma. El alcanfor de romero tiene efecto hipertensor (sube la tensión) y tonifica la circulación sanguínea. Por sus propiedades antisépticas, se puede aplicar por decocción sobre llagas y heridas como cicatrizante. También posee una ligera cualidad emenagoga (regular la menstruación). Cura heridas y llagas. De sus hojas se obtiene el "agua de la reina de Hungría", para

perfumería y también un agua destilada que se utiliza como colirio, la esencia puede usarse para combatir dolores reumáticos. En la cocina se utiliza para asados, guisos, sopas y salsas y además se puede preparar "vino de romero" con propiedades benéficas para la función estomacal así como en la fabricación de jabones, desodorantes, cosméticos, perfumes, etc.^{1,34,48,49}

3.2.1.11 Efectos secundarios y contraindicaciones

Se considera que el principio activo del romero carece de toxicidad; sin embargo, las personas especialmente sensibles pueden experimentar reacciones alérgicas, especialmente dermatitis por contacto. Asimismo, no es recomendable que las personas con cálculos biliares recurran a esta droga sin consultar previamente con un médico. Esto es debido a que cuando existe litiasis biliar, un aumento del drenaje de la vesícula biliar puede ir acompañado de una obstrucción de los conductos biliares.^{9,11}

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

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

El romero no debe usarse en el transcurso del embarazo, ya que existe la posibilidad de que induzca un aborto espontáneo por su posible efecto estrogénico. Tampoco debe emplearse durante la lactancia.^{9,11}

3.2.1.12 Uso del *Rosmarinus officinalis* en odontología

Nuestro país está considerado entre los doce países de mayor diversidad biológica de la tierra, sin embargo, solo le damos importancia a la medicina tradicional. El conocimiento científico de ciertas especies es desconocido. En el área dental solamente se han investigado escasas plantas; en cuanto al romero solo se utiliza de manera tradicional.⁷ Pero en otros países se han realizado muchos trabajos con el romero tanto en medicina como en odontología. Brasil es uno de los países que más ha estudiado al romero siendo utilizadas en diversa formulaciones farmacéuticas, así tenemos: los enjuagues bucales, colutorios, soluciones tópicas, pasta dental, etc.²³

3.2.1.13 El *Rosmarinus officinalis* en el Perú

El romero fue introducido nuestro país en el año 1579, es traído por los españoles desde la península Ibérica.¹¹ A partir de esa época es cultivado en los huertos, también crece de manera silvestre debido a su gran adaptabilidad; es así, como se distribuye por todo el Perú abarcando la costa, sierra y selva. Actualmente se cultiva en grandes proporciones en los diferentes valles; es utilizado por la población peruana de manera casera debido a que tiene múltiples propiedades medicinales. Se utilizan sobre todo las hojas y a veces las flores para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias, se utiliza para evitar la caída del cuero cabelludo. La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el

hígado, también es aplicado sobre llagas y heridas como cicatrizante, para regular la menstruación, para perfumería y también en la cocina se utiliza para asados, guisos, sopas y salsas, así como en la fabricación de jabones, desodorantes, cosméticos, perfumes, etc.^{7,50}

3.2.4 Clorhexidina

3.2.4.1 Historia

La clorhexidina se desarrolla en la década de los 40 en Inglaterra por científicos en un estudio contra la malaria, y salió al mercado en 1954 como antiséptico para las heridas de la piel. Posteriormente comenzó a utilizarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano.⁵¹

En odontología empezó a utilizarse para desinfección de la boca y en endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia, fue el realizado por Løe y Schiott en 1970 donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0.2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y el desarrollo de gingivitis.⁵¹⁻⁵³

3.2.2.2 Estructura y características químicas

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que decimos que es una bisguanida, la cual está conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida. Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a PH superior a 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que lo hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y su dificultad para formularla en productos.

Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en su forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua (Fardal y Tumbull 1986).⁵⁴

3.2.2.3 Mecanismo de acción

La clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). En boca se adsorbe rápidamente a las superficies de contacto, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo. Su PH óptimo se encuentra entre 5.5 y 7.0. En función del PH ejerce su acción frente a diferentes bacterias. Con un PH entre 5.0 y 8.0, es activa frente a bacterias Gram+ y Gram-.

El efecto antiplaca se produce a través de cuatro mecanismos:⁵⁵

1. La clorhexidina bloquea los grupos ácidos libres de las glicoproteínas salivales (mucinas), las cuales forman la película adquirida que permitirá la formación de la placa bacteriana, siendo ésta su primera capa, no permitiendo la formación de la misma.
2. La carga iónica positiva de la clorhexidina atrae a la superficie microbiana de carga negativa, a lo que contribuye el PH del medio, el cual es neutro o básico, permitiendo que los microorganismos se unan a las moléculas de clorhexidina y no se adhieran a la película adquirida.
3. La clorhexidina también destruye la placa formada al competir con el ión calcio, factor coadyuvante de la formación y crecimiento de la placa bacteriana que actúa como una molécula de enlace que permite a las

bacterias fijarse a la película adquirida sin impedimentos. Cuando la clorhexidina se une al ión calcio, impide la unión del mismo a las bacterias.

4. A altas concentraciones la clorhexidina produce tras unirse a la pared bacteriana, cambios electroforéticos que producen una precipitación citoplasmática que conlleva la muerte celular.

3.2.2.4 Farmacocinética.

Los estudios farmacocinéticos de clorhexidina, indican que aproximadamente el 30 % del principio activo, se retiene en la cavidad oral después del enjuague. La clorhexidina retenida se libera lentamente en los fluidos orales. Estudios realizados en animales y en humanos, demuestran la escasa absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal. Los niveles plasmáticos de clorhexidina alcanzan un pico máximo de 0.206 microgramos por gramo en humanos, 30 minutos después de la ingestión de 300 mg de clorhexidina. No se encontraron niveles, detectables en plasma de clorhexidina después de 12 horas de la ingesta. La excreción de clorhexidina se realiza fundamentalmente por las heces (90 %); menos del 1 % se excreta por la orina.^{51,54,55}

3.2.2.5 Concentraciones.

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0.12 % y al 0.2 %, se recomienda realizar un buche con 10ml de producto a una concentración del 0.2 % y de 15ml al 0.12 %, esto es debido a la dosis total de clorhexidina ya que 10ml al 0.2 % libera 20mg y 15ml al 0.12 % libera 18mg, observándose que los resultados con ambas formulaciones son igual de efectivos.⁵⁶

3.2.2.6 Medios de presentación y formas comerciales

La eficacia de clorhexidina depende de su forma de presentación. Así encontramos: Colutorios, dentífricos, geles, barnices, aerosoles, depósito de liberación lenta, chicles con clorhexidina. etc. Siendo el método más utilizado en colutorio para la mayoría de situaciones como coadyuvante de la higiene oral. Su forma de presentación más común es en solución al 0.12 % para enjuagues de 15 ml durante 30 segundos y al 0.2 % para enjuagues de 10 ml.⁵⁶

3.2.2.7 Indicaciones

Esta indicado como agente antiplaca, para el tratamiento de gingivitis y periodontitis, en cirugía periodontal, como irrigador en alveolitis, como desinfectante en estomatitis por dentaduras (candidiasis subplaca), como tratamiento de ulceraciones aftosas y como coadyuvante en halitosis. Su uso se recomienda dos veces al día, como enjuague oral debe ser usado por lo menos 30 segundos. No se debe ingerir y debe expectorarse después de enjuagarse.⁵⁶

3.2.2.8 Efectos secundarios

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

Otro efecto secundario de los enjuagues con clorhexidina es la alteración del sentido del gusto como la hipogeusia y disgeusia, también se observa sensación de quemazón, sequedad de tejidos blandos, y lesiones descamativas y ulcerosas de la mucosa gingival. Además un efecto colateral frecuente reflejado por los usuarios de colutorios de clorhexidina es su desagradable sabor amargo.⁵⁶

3.2.5 Ecología de cavidad bucal

La ecología comprende el estudio de las relaciones entre los microorganismos y el ambiente. La cavidad bucal se considera un ambiente y sus propiedades influyen

en la composición y la actividad de los microorganismos que en él se encuentran. El sitio donde los microorganismos crecen es el hábitat. Los microorganismos que permanecen y se desarrollan en un hábitat particular constituyen una comunidad microbiana formada por especies individuales. La comunidad en su hábitat específico, junto con los elementos abióticos con los cuales los microorganismos están asociados, constituyen un ecosistema.⁵⁷

Los microorganismos que componen la microbiota bucal coexisten en ecosistemas que están regulados por una serie de factores conocidos como determinantes ecológicos internos y externos, por tanto, la flora bucal es una entidad dinámica afectada por numerosos cambios durante la vida del huésped. La microbiota de la cavidad bucal es compleja, hasta el 2001 se reconocían 500 especies; actualmente se calcula que serían unas 700 las que habitan, ya que las técnicas de biología molecular han permitido establecer diferencias e identificar diversos microorganismos y sus genes.⁵⁸

3.2.3.1 Origen y desarrollo de la microbiota oral

Por lo general, la boca del feto a término es estéril, aunque al nacimiento puede adquirir microorganismos transitorios a partir de la vagina. La boca del niño recién nacido adquiere microorganismos con rapidez, de la madre y también del ambiente. Pueden aislarse varias especies de *estreptococos* y *estafilococos*, junto con *coliformes*, *lactobacilos*, especies *Bacilos*, especies *Neisseria* y levaduras. La especie más común que se aísla de la boca de los recién nacidos, es el *Streptococcus salivarius*, y junto con el *Staphylococcus albus*, *Neisseria* y *Veillonella*, forman el conglomerado inicial. En otras ocasiones, *Candida albicans* se multiplica con rapidez en la boca y el pH bajo que se produce impide el crecimiento normal de otros comensales. Una proliferación excesiva de levaduras produce lo que se conoce como afta bucal⁵⁷⁻⁶⁰

Infancia y niñez: El lactante se pone en contacto con una variedad de microorganismos, algunos de los cuales se establecerán como parte de la flora común del individuo. Los microorganismos comensales de otras partes del cuerpo y los del ambiente, pueden existir también en la cavidad bucal y otros se quedarán ahí. La erupción de los dientes temporales proporciona una superficie diferente para la adherencia microbiana y esto se caracteriza con la aparición del *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans* como habitantes regulares de la cavidad bucal. Con el aumento en el número de dientes y los cambios en la alimentación se modificarán las proporciones globales de los microorganismos. Unos cuantos anaerobios llegan a establecer pero como el surco gingival no es profundo, su número permanece pequeño. Habitualmente se encuentran actinomicetos, *Lactobacillus* y *Rothia*.⁵⁷⁻⁶⁰

Adolescencia: Quizás el incremento mayor en el número de microorganismos en la boca se produce cuando hacen erupción los dientes permanentes. Estos tienen fisuras profundas en su superficie lo que hace que sean difíciles de desalojar. Los espacios interproximales son mucho mayores que en la dentición temporal pues los dientes tienen un “cuello” más pronunciado en la unión amelo cementaria. El surco gingival es más profundo que en los dientes temporales y permite un incremento mayor en los microorganismos anaerobios. La especie *Prevotella* queda fijada en cantidad abundante, así como las especies *Leptotrichia* y *Fusobacterium* y las espiroquetas. Las lesiones de la caries dental crearán un ambiente nuevo en el cual surgirán algunos microorganismos, en especial, *estreptococos*. En términos ecológicos la flora del final de la adolescencia y el principio de la edad adulta, antes de la pérdida de los dientes, es el clímax del conglomerado microbiano.⁵⁷⁻⁶⁰

Edad Adulta: Se considera que la complejidad de la flora bucal del adulto es quizás su característica principal. Puede haber cantidades variables de placa dental y el grado de enfermedad periodontal crónica estará en relación al número y tipos de

microorganismos encontrados. Las lesiones cariosas y las restauraciones poco satisfactorias propiciarán ambientes para acumulaciones locales de bacterias. La mayoría de estudios de la flora bucal del adulto, muestran que existen variaciones considerables entre los individuos, en el número total de bacterias y en las proporciones de muchas de las especies. De acuerdo con las tendencias observadas en el adolescente hay un incremento en la especie *Prevotella* y las espiroquetas con el avance de la enfermedad periodontal y la madurez de la placa dental. La placa superficial contiene pocos estreptococos, principalmente *Streptococcus mutans* y *sanguis*. También se aíslan con regularidad *actinomicetos* y otros filamentos Gram positivos y gramnegativos de posición taxonómica incierta. Conforme los dientes se pierden, el número de sitios disponible para la colonización bacteriana disminuye; se reduce la cantidad de bacterias y varias especies disminuyen en cantidades desproporcionadas. Los individuos edéntulos albergan pocas espiroquetas y prevotellas, pero aumenta el número de levaduras. Normalmente las levaduras se ubican en el dorso de la lengua y en el surco bucal superior. Las dentaduras postizas proporcionan un medio protegido en el cual las levaduras pueden multiplicarse y cubrir el paladar duro y la superficie acrílica de la prótesis dental.⁵⁷⁻⁶⁰

3.2.3.2 Sistema inmune de cavidad bucal⁵⁸

Variabilidad: Esta en relación a las variantes cualitativas y cuantitativas de la flora microbiana oral, unos en relación a otros, o entre distintos individuos, incluso en un mismo sujeto en distintas horas del día o épocas de su vida. Se ve influenciada por factores del hospedador.

Cantidad: La cantidad de flora microbiana en la cavidad oral es elevada y además estos se hallan en espacios muy reducidos. Por ejemplo en las placas supragingivales

pueden hallarse un promedio de 10^{11} a 10^{12} microbios por gramo de peso húmedo de placa supragingival o Biofilm.

Especificidad: Los microbios orales son específicos en determinadas áreas como lengua, surco, carrillo, etc.

Heterogeneidad: Hay gran variedad de géneros y especies que pueden hallarse en los diferentes ecosistemas orales.

3.2.3.3 Factores que alteran el desarrollo de la flora bucal

Para que un microorganismo se establezca en la boca, debe: Introducirse, ser retenido, ser capaz de multiplicarse en las condiciones existentes en la boca.^{58,61}

Introducción. Aunque desde el nacimiento se introducen en la boca una extensa variedad de microorganismos, solo ciertas especies son capaces de establecerse en ella. Muchos de estos microorganismos tienden a ubicarse en sitios particulares como labios, dorso de la lengua, paladar duro, otros tejidos blandos, surco gingival o dientes.

Retención. La retención de los microorganismos, por lo general, está confinada a un sitio particular en la boca, probablemente como consecuencia de la interacción, a menudo compleja de los mecanismos de retención y desprendimiento.

Adherencia. Algunas bacterias tienen la habilidad de adherirse a los tejidos blandos; *Streptococcus salivarius* puede adherirse a la superficie del dorso de la lengua y también a otros tejidos blandos. Otros, en particular *Streptococcus mutans* y *sanguis*, se adhieren al esmalte debido a la producción de polisacárido extracelular por la bacteria. Es posible que algunos actinomicetos bucales se adhieran por medio de un

mecanismo hialurónico mediado por ácidos. Otras bacterias pueden pegarse simplemente a la matriz celular producida por otros. Las bacterias que se adhieren débilmente como la especie *Veillonella* se alojan en defectos del esmalte, fisuras oclusales y fósas donde se protegen de las fuerzas de desprendimiento.

Sitios protegidos. Además de lo anterior, la matriz adherente de la placa dental proporcionará un ambiente protegido para las bacterias que no poseen mecanismo alguno de adherencia. No obstante, el sitio protegido de mayor tamaño es el surco gingival, donde especies como *Prevotella melaninogenicus* y las *espiroquetas* pueden sobrevivir.

Fuerzas de desprendimiento. Estas incluyen el flujo salival, el movimiento de la lengua y de los tejidos blandos y la acción abrasiva de los alimentos. La circulación del líquido del surco gingival y la fagocitosis en el surco también sirven para eliminar bacterias.

Multiplicación. Para permanecer como parte de la flora bucal, un microorganismo debe ser capaz de multiplicarse en el sitio particular en que puede ser retenido. Este fenómeno depende de cierto número de factores:^{58,61}

- **Disponibilidad de sustratos** Para que las bacterias puedan proliferar, deben ser capaces de metabolizar los sustratos disponibles de la dieta o en los productos metabólicos de otros microorganismos que están en el mismo sitio o en uno próximo.
- **pH** El metabolismo de los microorganismos depende con frecuencia del pH y las bacterias inhibidas por el bajo pH no pueden sobrevivir en las condiciones ácidas de la placa dental o bajo la base de una dentadura postiza. *Prevotella melaninogenicus* y la especie *Veillonella* no toleran

un pH menor de 5,5 aproximadamente pero la especie *Lactobacillus* y *Candida albicans* pueden tolerar proporciones muy bajas de pH.

- **Oxidación o reducción en el medio circundante** El potencial de oxidación-reducción (Eh) del sitio es con frecuencia importante para determinar la naturaleza de la flora en ese lugar. Los microorganismos anaerobios como, *Prevotella*, *Fusobacterias*, *Espiroquetas* y algunos *actinomicetos* sólo se desarrollarán en ambientes reductores. Los requerimientos para la reducción son variados; *actinomicetos*, la especie *Capnocytophaga* y la especie *Campylobacter* toleran un ambiente con menor reducción que el exigido por la especie *Prevotella*, las *Fusobacterias* y en especial las *espiroquetas*. Un potencial bajo de oxidación-reducción sólo puede lograrse con facilidad en el surco gingival y en la capa más profunda de la placa dental. De aquí se infiere la explicación del porqué las bacterias anaerobias están confinadas a esos sitios.
- **Interacciones microbianas** La complejidad de las comunidades de microorganismos es el resultado de un sinnúmero de interacciones microbianas. Algunas son nutricionales como proveer ácido paraaminobenzoico, el *Streptococcus sanguis* para el *Streptococcus mutans* en ambiente reductor; el aporte de vitamina K por varios microorganismos para *Prevotella melaninogenica* que a su vez produce sustrato para el *Campylobacter sputorum*. Las *espiroquetas* dependen de varios factores producidas por otras tantas bacterias, lo que quizá indica porqué estos microorganismos sólo pueden establecerse en los surcos gingivales después de que el resto de la flora normal se ha desarrollado.

3.2.3.4 Flora Microbiana en la Cavity Oral^{58,61}

Labios. En los labios hay una transición de piel a mucosa bucal y existen también cambios en la población bacteriana. Predominan el *Staphylococcus albus* y los *micrococcos* cutáneos con cantidades abundantes de *estreptococos* típicos de la boca. Si las comisuras de la boca se humedecen con la saliva, puede desarrollarse una queilitis angular de cuyo raspado es posible cultivar *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*

Mejilla. Los resultados de los estudios varían unos de otros, pero la bacteria predominante en la parte interior de la mejilla es el *Streptococcus miliar* y le siguen en frecuencia *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius*.

Paladar. El paladar duro presenta una flora estreptocócica semejante a la de la mejilla. Los hemófilos se encuentran con regularidad y los *lactobacilos* son comunes. Los escasos anaerobios encontrados sobre membranas expuestas es casi seguro que no proliferen. Las levaduras y *lactobacilos* aumentarán en forma muy importante en algunas personas que utilizan dentaduras postizas y la flora puede alterarse mucho cuando el paladar es protegido de la acción de lengua y la saliva por la base de una prótesis.

El paladar blando albergará bacterias de las vías respiratorias como *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Neisseria* y *Branhamella*. Los portadores de *Streptococcus B-hemolíticos* con frecuencia tendrán los microorganismos en la úvula y en los pliegues palatogloso y palatofaríngeo.

Lengua. La superficie dorsal queratinizada de la lengua es un sitio ideal para la retención de microorganismos. Aunque varía el número de *Streptococcus salivarius* es el microorganismo predominante y representa el 20-50 % de la flora cultivable total. *Streptococcus mitis* también es común y la especie *Haemophilus* ha sido aislada con

regularidad. El dorso de la lengua es colonizado a menudo con cantidades pequeñas de *Candida albicans*. El *Micrococcus mucilagenous* es un microorganismo raro que semeja un *estafilococo* pero produce una sustancia mucosa extracelular que puede explicar su retención sobre la lengua. El microorganismo representa 3-4 % de la flora cultivable en la mayoría de los individuos y se aísla únicamente del dorso de la lengua.

Surco gingival. La población bacteriana del surco gingival es quizás la más numerosa en toda la boca, con 10^{10} - 10^{11} microorganismos por gramo de peso húmedo de detritus gingivales. Se han hecho innumerables estudios de esta estructura muy relacionados con trabajos acerca de la placa dental, supra o subgingival. El surco gingival tiene una relativa protección de las fuerzas que desalojan a las bacterias; no obstante, el líquido crevicular en el surco proporciona un medio rico en nutrientes que permite que proliferen algunos de los microorganismos más delicados.

Dientes. Todos los dientes tienen microorganismos adheridos, usualmente en depósitos denominados placa dental. Las fuerzas para desalojar bacterias, tales como los alimentos, la saliva y los tejidos blandos, tienden a remover esta placa de las superficies lisas del esmalte, o bien, de áreas linguales palatinas y bucales. Estos depósitos bacterianos se forman finalmente como sigue: En las fisuras y fóselas oclusales, en defectos del esmalte, en los espacios interproximales, cerca del borde gingival. La variación en la composición de la placa es amplia, pero los *estreptococos* bucales, los *bacilos*, filamentos Gram positivos y algunos anaerobios gramnegativos siempre están presentes.

Saliva. Los microorganismos que se denominan como parte de la flora de la saliva son los que se han desprendido de los diversos sitios de la cavidad bucal en donde se han asentado poblaciones bacterianas (piezas dentarias, lengua, mucosa de los carrillos y membranas mucosas de la faringe.⁶² La saliva del ser humano tiene aproximadamente

6000 millones (6×10^9) de bacterias por mililitro, entre las cuales están *estreptococos*, *peptostreptococos*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *espiroquetas*, *levaduras*, *protozoarios* y otros.

3.2.3.5 Saliva

3.2.3.5.1 Definición

La saliva es incolora, insípida, inodora, algo espumosa y muy acuosa, está constituido por sustancias provenientes de las glándulas salivales mayores y menores.⁶³ En el uso diario, el término saliva se utiliza como sinónimo de fluido oral para describir la combinación de líquidos que hay en la boca.

El conjunto de estos líquidos está compuesto, además de las secreciones de las glándulas salivales por una mezcla de pequeñas partículas alimentarias, microorganismos, células de descamación del epitelio oral, secreción del fluido gingival, secreción de glándulas sebáceas y otras partículas.⁵⁸ La saliva es considerada como un sistema con factores múltiples que actúan en conjunto e influyen en el estado de salud/enfermedad de la cavidad bucal.

El volumen de saliva segregado por una persona varía entre 700 y 800 ml diarios con un promedio de 0.3 ml por minuto. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo.^{58,63,64}

3.2.3.5.2 Componentes

La composición y el volumen de la saliva desempeñan un papel primordial en el mantenimiento de las condiciones normales de los tejidos orales y son un factor protector de gran importancia frente a la caries dental.⁵⁸ La mayor parte de la saliva es producida por las glándulas salivales mayores. Cerca del 65 % del volumen total de saliva es segregado por las parótidas; el 20 al 30 %, por las glándulas submandibulares; del 2 a 5 % por las glándulas sublinguales y el 7 % restante por las

glándulas salivares menores. La saliva es un líquido fluido, que contiene 99 % de agua y 1 % de sólidos disueltos, los sólidos pueden ser diferenciados en 3 grupos: componentes orgánicos proteicos, los no proteicos y los componentes inorgánicos o electrolitos.⁶⁴

Entre los componentes orgánicos se encuentra carbohidratos, lípidos, aminoácidos, inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG), proteínas ricas en prolina, glucoproteínas, mucinas, histinas, esteroles, cistatinas, urea, ácido úrico, lactato y algunas enzimas, tales como alfa amilasas, peroxidasa salivales y anhidrasas carbónicas. La saliva presenta, además gases disueltos como nitrógeno, oxígeno, y dióxido de carbono.

Dentro de los componentes inorgánicos se encuentran los iones de calcio, fosfato, sodio, potasio, carbonato, cloro, amonio, magnesio y flúor. El calcio es el elemento más importante, se encuentra unido a proteínas, ionizado o como ion inorgánico.⁶⁴

3.2.3.5.3 Tipos de la saliva

Saliva en reposo o no estimulada: Se define como aquella que es producida espontáneamente, en ausencia de estímulos salivales exógenos o farmacológicos y en situación de relajación.⁵⁸ El promedio de la velocidad de flujo salival no estimulada oscila entre 0,3 a 0,4 ml/min y sus valores pueden variar entre 0,08 y 1,83 ml/min.

Saliva estimulada: Es la que se obtiene después de haber sometido al sujeto a estímulos por una variedad de agentes (gustatorios y masticatorios) como cera o parafina. Difiere de la de reposo no solamente por la cantidad, sino también por presentar cambios en su composición.⁴⁹ El promedio de la velocidad de flujo salival estimulada es de 1 a 2 ml/min, encontrándose en una variación de 0,2 a 5,7 ml/min.⁶⁴

Saliva total: La saliva total es un compuesto de secreciones de las glándulas parótidas, submaxilares y sublinguales. Las numerosas glándulas mucosas menores también contribuyen al lago salival, pero también el líquido de la hendidura gingival y el exudado líquido de la mucosa bucal. La saliva total contiene también células epiteliales descamadas, leucocitos, bacterias y restos alimentarios.^{61,63}

4.2.3.5.4 Funciones de la saliva

La saliva proporciona un medio eficaz de protección a todas las estructuras gracias a su participación en distintas funciones digestivas, protectoras, homeostáticas y hormonales.⁶⁴

Lubricación y humectación: La saliva es uno de los mejores lubricantes de origen natural. Su ausencia o disminución hace que los alimentos se impacten y se retengan alrededor de los dientes, haciendo dificultosa la masticación de la comida. Proporciona una lubricación adecuada para la dicción.

Mantenimiento del equilibrio ecológico: La saliva mantiene el equilibrio ecológico de las distintas especies de microorganismo que viven en la cavidad bucal. La adherencia es crítica para la supervivencia de muchas bacterias, y una de las funciones básicas de la saliva es la de interferencia de dicho proceso mediante el flujo físico (acción hidrocinetica).⁶⁴

Limpieza: El flujo físico produce acción mecánica de lavado y arrastre, eliminando restos de alimento, elementos celulares descamados y numerosas bacterias, hongos y virus, manteniéndolos en suspensión.

Integridad dental: Además de amortiguar la acidez de la placa, el flujo físico de la saliva ayuda al aclaramiento de los azúcares.

Digestiva: La saliva es la primera secreción que va a entrar en contacto con el alimento. La saliva contiene una amilasa y es posible que su acción principal sea la de degradar el almidón.⁶¹

Función neutralizadora: Representa la amortiguación de cualquier cambio significativo del pH. Los tampones salivales provienen principalmente de los sistemas bicarbonato y fosfato.

Gusto: El agua diluye los componentes sólidos y excita a las células de las papilas gustativas. Lava las papilas y las deja en condiciones de ser estimuladas.

Diluyente y atemperadora: La saliva aumenta de forma brusca y masiva tras la penetración de sustancias ácidas con el fin de diluirlas y mantener el pH; pero también logra, por el mismo mecanismo enfriar los alimentos calientes o calentar los fríos.

Excretora: La saliva es la ruta por la que se van a eliminar productos orgánicos y productos introducidos en el organismo.

Acción sobre la coagulación: La saliva activa en su conjunto la coagulación de la sangre por la presencia de lisozima y calcio salival, aunque de manera muy discreta.

FUNCIONES	COMPONENTES
Lubricación	Mucina, glicoproteínas ricas en prolina, agua
Antimicrobiana	Lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasas, mucinas, cistinas, histatinas, inmunoglobulina, proteínas rica en prolina, Ig A
Mantenimiento de la integridad de la mucosa	Mucinas, electrolitos, agua
Limpieza	Agua
Capacidad tampón y remineralización	Bicarbonato, fosfato, calcio, staterina, proteínas aniónicas ricas en prolina, flúor
Preparación de los alimentos para la degluciones	Agua, mucinas
Digestión	Amilasa, lipasa, ribonucleasas, proteasas, agua, mucinas
Sabor	Agua, gustina
Fonación	Agua, gustina

Cuadro N° 01: Funciones y componentes de la saliva⁶⁵

3.2.3.5.5 Flora microbiana

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.⁶¹

MICROORGANISMO	SALIVA
1. Cocos 1.1 Gram positivos anaerobios facultativos 1.2 Gram negativos preferentemente aerobios 1.3 Gram positivos anaerobios estrictos 1.4 Gram negativos anaerobios estrictos	65% 44% 3% 3% 15%
2. Bacilos 2.1 Gram positivos anaerobios facultativos 2.2 Gram positivos preferentemente aerobios 2.3 Gram positivos anaerobios estrictos 2.4 Gram negativos anaerobios facultativos 2.5 Gram negativos anaerobios estrictos	35% 15% 2% 7% 4% 7%
3. Treponemas	--

Cuadro N° 02: Distribución aproximada de microorganismo en la saliva

3.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen.

- **Extracto etanólico:** Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente (en este caso alcohol), en proporción variable, capaz de solubilizar los principios activos.

- **Flora salival:** Géneros y especies microbianas presentes en la saliva.

- **Actividad antibacteriana:** Es la acción que ejerce una sustancia en el desarrollo o crecimiento de las bacterias.

- **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un disco embebido de extracto etanólico de (romero) en el que no se produce crecimiento bacteriano.

3.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.4.1 HIPÓTESIS

- Existe efectividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a flora salival.

3.4.2 VARIABLES

- **Variable independiente:** Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero)
- **Variable dependiente:** Efecto antibacteriano del *Rosmarinus officinalis* (romero).
- **Variables de control**
 - Control positivo:** Clorhexidina al 0.12 %
 - Control negativo:** Agua destilada

3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES			
	Indicador	Instrumento	Escala	Fuente
VI 1: Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)	Concentración del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)	Técnica para la obtención del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)	25 mg/ml 50 mg/ml 75 mg/ml	Hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)
VI 2: Flora bacteriana saliva	Crecimiento bacteriano	Cultivo en Agar Trypticase Soya	Si No	Saliva de pacientes de la clínica odontológica de la UNMSM
VD: Efectividad antibacteriana	Medida de los halos de inhibición del crecimiento	Técnica por método de difusión en discos	Valores dados en milímetros de diámetro	Placas Petri con cultivos bacterianos

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de investigación

Experimental. Porque se va a valorar el efecto de una o más variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.

Comparativo. Porque permite contrastar los resultados del experimento.

In vitro. Porque la técnica para realizar el experimento se realiza en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

4.2 Población y muestra

4.2.1 Población

Estuvo constituido por pacientes que acudieron a la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el año 2013.

4.2.2 Muestra

Conformado por 22 pacientes de ambos géneros de 18 a 60 años de edad, que acudieron a la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el año 2013.

4.2.2.1 Tipo de muestreo

Los pacientes se eligieron en forma intencional y no probabilística, previa aceptación del consentimiento informado; estuvieron conformados por 22 pacientes de la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.2.2.2 Unidad de muestra

Muestra de saliva de 22 pacientes de 18 a 60 años de edad, que acudieron a la clínica de diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor De San Marcos en el año 2013.

4.2.2.3 Criterios de inclusión.

- Pacientes ambulatorios de ambos sexo.
- Pacientes mayores de edad entre 18 a 60 años.
- Pacientes que firmaron su consentimiento informado para la obtención de muestra.
- Pacientes que no reciban tratamiento antibiótico.

4.2.2.4 Criterios de exclusión.

- Pacientes que sean edentulos totales.
- Pacientes que consuman fármacos.
- Pacientes que tengan enfermedades sistémicas, agudas o crónicas que repercutan en el sistema estomatognático.
- Pacientes que cursen cuadros de caries dental y enfermedad periodontal de forma generalizada.

4.3 Recursos y materiales

4.3.1 Recursos

Recursos Ambientales:

- Apoyo en la preparación del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* por el Laboratorio de Química Orgánica y el Laboratorio del

CENPROFARMA de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Apoyo en el tamizaje fitoquímico (análisis cualitativo) del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* por el Laboratorio de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Apoyo de la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Apoyo en la realización del trabajo por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Recursos Humanos:

- Químico farmacéutico
- Microbiólogo.
- Operador de estadística.
- Digitador.

4.3.2 Materiales:

Materiales y equipos para extraer el extracto etanólico

- Hojas, flores y talluelos de (romero)
- Balanza
- Refrigeradora
- Balón de fondo plano

- Soporte
- Refrigerante de bolas o serpentín
- Vaso de precipitado
- Alcohol de 96°

Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo

- Medios de cultivo enriquecidos Agar TSA
- Balanza
- Agua destilada
- Probetas
- Matraz de Erlenmeyer
- Placas Petri
- Pipetas
- Esterilizador de calor seco (horno)
- Autoclave
- Mecheros
- Estufa (incubadora)
- Microscopio
- Refrigeradora
- Tubos de prueba
- Guantes
- Hisopo

Materiales para la obtención de muestra

- Placas Petri estériles
- Formato de Consentimiento informado
- Instrumental de diagnóstico odontológico
- Guantes estériles

- Mascarilla
- Mechero

Materiales para la recolección y procesamiento de datos

- Fichas de recolección de datos y lápices.
- Computadora.
- Programa estadístico SPSS.
- Impresiones.
- Anillados y empastados.

4.4 Procedimientos y técnicas

Obtención del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero)

La planta en estudio, *Rosmarinus officinalis* (romero) fue recolectada en la hacienda Santa María en el valle de Tarma, departamento de Junín-Perú a 3.050 msnm. Luego es trasladada a las instalaciones del Instituto de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; la obtención del extracto estuvo a cargo del **Dr. Américo Castro Luna**. Posteriormente las hojas y flores fueron separadas del tallo, luego fueron pesadas en una balanza común, se pesaron 1 Kg, luego se colocaron en un frasco de vidrio de color ámbar y se le agregó 2 L de etanol de 70⁰, dejándose macerar por 1 semana, agitándolo todos los días. El producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatmann N° 41, un segundo filtrado fue realizado con papel filtro Whatmann N° 2 y por último un tercer filtrado fue en papel Whatmann N° 1. Obteniéndose extracto purificado libre de gérmenes. Luego el filtrado fue colocado en un recipiente de vidrio de boca ancha y se llevó a la estufa a 37 °C durante una semana hasta que el alcohol se evapore por completo, quedando solo el extracto puro, se obtuvo una masa seca de extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* la cantidad de 50 gr. Luego fue colocado en un frasco de vidrio, de color ámbar para su conservación y fue llevado al

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A partir de la masa de extracto seco de *Rosmarinus officinalis* se prepararon concentraciones de 25, 50 y 75 mg/ml las que fueron guardadas en frascos color ámbar estériles y conservadas en refrigeración hasta el momento que dichas concentraciones sean colocados en los pocillos para probar su efecto antibacteriano sobre la flora salival.

Paralelamente, una muestra de la planta fue llevada al Museo de Historia Natural para su identificación taxonómica (ver Anexo).

Obtención de la muestra salival:

Selección de pacientes

La población de pacientes que asistieron a consulta en la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la UNMSM, durante el mes de febrero del año 2013, se eligieron 22 pacientes adultos, entre 18 y 60 años de edad, de los cuales 10 fueron mujeres y 12 hombres; cada paciente fue informado sobre el proyecto de investigación y procedió a firmar la hoja de consentimiento informado.

Para la toma de muestra

La muestra salival se obtuvo directamente de la cavidad bucal, con la característica de ser saliva no estimulada, se obtuvo una muestra de 3 ml de saliva por persona, tratando de obtenerla en un solo intento y en un recipiente estéril para evitar la contaminación de la muestra y llevado inmediatamente al laboratorio de microbiología para su procesamiento.

Estandarización de la muestra salival

Seguidamente la muestra se estandarizó por comparación con la escala de turbidez del tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland, para lo cual se utilizó 2 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo y se procedió a agregar y homogeneizar la muestra salival hasta que se obtuvo la misma turbidez que el patrón de tubo N° 0.5 del Nefelómetro Mc Farland.

Siembra de la muestra

Se utilizó el método de difusión en agar. El medio de cultivo que se utilizó fue el Agar TSA y se tomó 100 ul de la muestra estandarizada y se colocó sobre el medio solido de cultivo TSA, se procedió hacer la siembra por diseminación con un hisopo estéril sobre todo el área de la placa Petri. Se dejó de 3 – 5 minutos para el secado.

Prueba de Actividad Antibacteriana

Una vez realizada la siembra de la muestra en el Agar TSA en la placa Petri, se procedió a la elaboración de cinco pocillos, con un diámetro de 5 mm, de 50 ul de capacidad (ver anexo) La distribución fue: 01 pocillo al centro para la clorhexidina al 0.12 % que es el control positivo, 03 pocillos alrededor de la placa para las concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml de *Rosmarinus officinalis* (romero) y 01 pocillo para el agua destilada que es el control negativo.

Se marcó en la base de la placa puntos debidamente rotulados que indicaron la posición de los pocillos y el tipo de solución para cada uno. Así mismo se enumeró cada placa con números arábigos del 1 al 22 en relación al número de muestras tomadas. Luego se colocaron en cada pocillo 50 ul de cada una de las soluciones sobre la superficie del medio y se dejó reposar por 30 minutos antes de incubarlo.

Incubación

Posteriormente se procedió la colocación de las placas Petri en una jarra, incorporándole luego una vela encendida y cerrándola herméticamente (método de la vela) para después llevarla a la incubadora a 37 °C por 48 horas para luego proceder con la lectura.

Coloración Gram

Se tomó microorganismos que crecieron alrededor de los halos y se procedió a realizar la coloración Gram, al llevarlo al microscopio se observó que estos pertenecían al grupo de bacterias cocos Gram positivos y Gram negativos.

El efecto antibacteriano se consideró en función al diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad limite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

4.5 Procesamiento de datos

El presente trabajo se utilizó un instrumento que fue llenado por el investigador. El instrumento tuvo la siguiente característica:

- Tuvo la función de recolectar y registrar los datos sobre la medida individual de los halos en mm, formados alrededor de cada pocillo presente en las placas sembradas.
- A las 48 horas de haber realizado la siembra se procedió a hacer las lecturas y el llenado de la ficha de recolección, tomando en cuenta:

1. Identificación de la muestra.
2. Identificación de la concentración utilizada
3. Medida en milímetros del halo de inhibición formado.

4.6 Análisis de resultado

Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se midieron y compararon los diámetros de halo de inhibición, entre los grupos que presentaban extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* y clorhexidina 0,12 %.

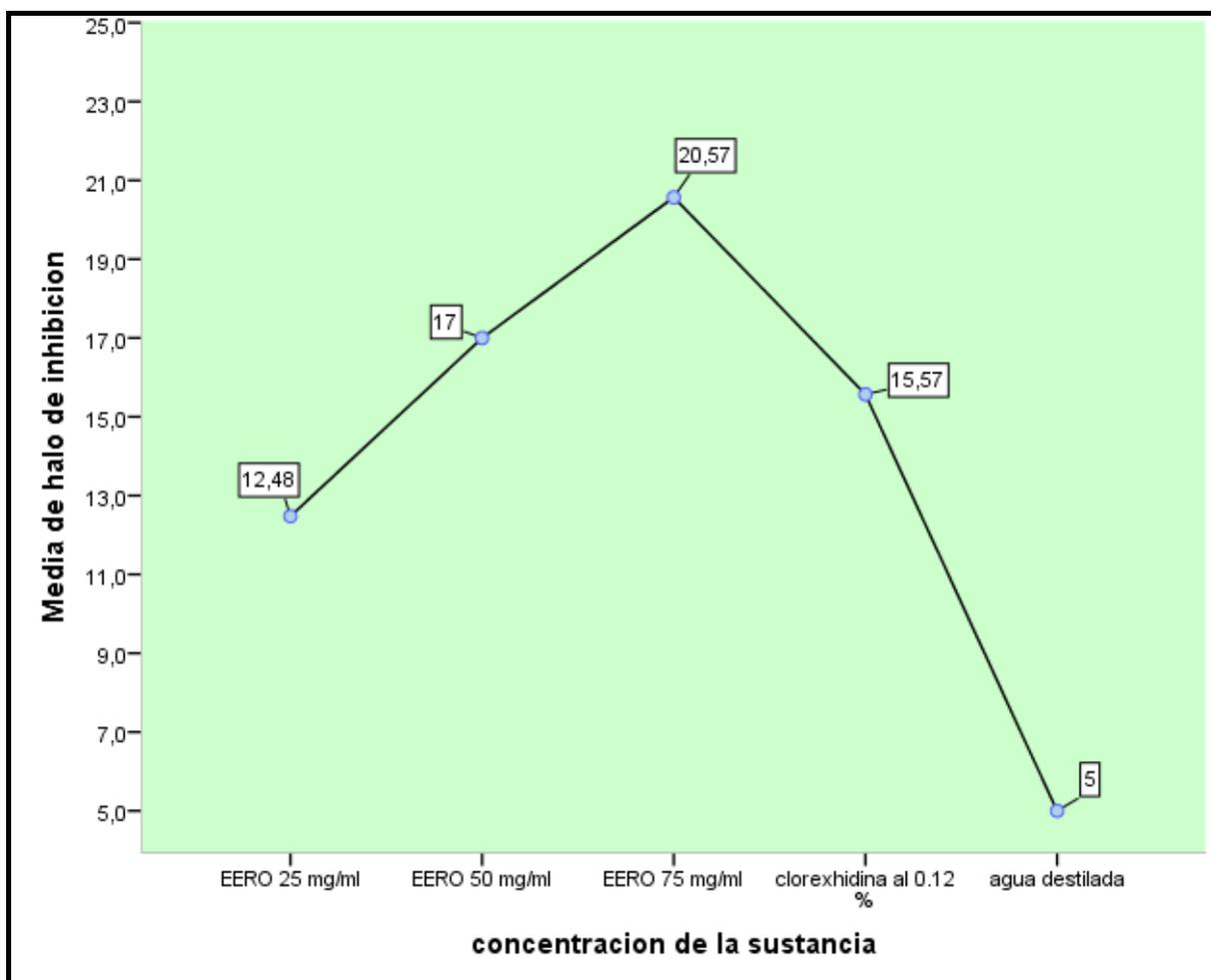
El análisis se realizó con Software SPSS v20. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para determinar la normalidad de la distribución de los datos, así como también la prueba de Levene para verificar la homogeneidad.

Para interpretar los resultados obtenidos en la investigación se compararon estos utilizándose el método de análisis estadístico: medias de tendencia central y dispersión; tales como el promedio, máximo, mínimo y desviación estándar.

Para establecer si hubo diferencias de los halos de inhibición por solución se utilizó la prueba de Anova. Se aplicó la prueba de Bonferroni de comparaciones múltiples entre el grupo de estudio (extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*), el grupo de control positivo (clorhexidina 0,12%) y de control negativo (agua destilada), a fin de evaluar las diferencias significativas que puedan existir en relación al promedio del diámetro de inhibición.

V. RESULTADOS

Gráfico N° 02: Promedio del halo de Inhibición del efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de EERO sobre flora salival.



EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*

En la figura 02. Se observa los promedios del halo de inhibición de las soluciones experimentales. El menor promedio del halo de inhibición corresponde al agua destilada 5 mm, seguido por el EERO de 25 mg/ml 12,47 mm, la clorhexidina 0,12 % 15,56 mm, el EERO de 50 mg/ml 17 mm y el EERO de 75 mg/ml 20,56 mm, con un intervalo de confianza del 95 %.

Cuadro N° 03: Halos de inhibición del efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de EERO sobre flora salival

		concentración de la sustancia				
		EERO 25 mg/ml	EERO 50 mg/ml	EERO 75 mg/ml	Clorhexidina al 0.12 %	agua destilada
halo de inhibición	Media	12,47	17,00	20,56	15,56	5,00
	Máximo	24,0	29,0	32,0	17,0	5,0
	Mínimo	9,5	12,5	15,0	13,5	5,0
	Desv. Tip.	3,66	4,82	4,69	0,83	0,00

EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*

Para la concentración del EERO de 25 mg/ml se observa el mayor diámetro de halo de inhibición mide 24 mm y el menor 9,5 mm; para la concentración del EERO de 50 mg/ml se observa el mayor diámetro de halo de inhibición mide 29 mm y el menor 12,5 mm; para la concentración del EERO de 75 mg/ml se observa el mayor diámetro de halo de inhibición mide 32 mm y el menor 15 mm, para el grupo control positivo clorhexidina 0.12% se observa el mayor diámetro de halo de inhibición miden 17 mm y el menor 13,5 mm, para el grupo control negativo agua destilada se observa el mayor y menor diámetro mide 5 mm. Los promedios de halo de inhibición incluye el diámetro del pocillo (5mm).

Al realizar la prueba de Anova one way, entre las diferentes concentraciones de EERO y las soluciones de control clorhexidina 0,12 % y agua destilada, se obtuvo un valor ($p < 0.05$), por tanto existe diferencia significativa entre ellos.

Cuadro N° 04: Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EERO de 25 mg/ml y las soluciones de control

<i>Sustancia (I)</i>	<i>Sustancia (J)</i>	<i>Diferencia de medias (I-J)</i>	<i>P</i>
EERO 25 mg/ml	clorhexidina 0.12 %	-3,09	0,03
	agua destilada	7,47	0,00
clorhexidina 0.12 %	EERO 25 mg/ml	3,09	0,03
	agua destilada	10,56	0,00
agua destilada	EERO 25 mg/ml	-7,47	0,00
	clorhexidina 0.12 %	-10,56	0,00

EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*

La prueba de Bonferroni, demuestran la comparación múltiple entre el EERO de 25 mg/ml, clorhexidina 0,12 %, y agua destilada. (Cuadro 02.)

En la comparación por pares entre el EERO de 25 mg/ml y clorhexidina 0,12 % ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 3,09 mm a favor de la clorhexidina.

En la comparación por pares entre el EERO de 25 mg/ml y el agua destilada ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 7,47 mm a favor del EERO de 25 mg/ml

Cuadro N° 05: Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EERO de 50 mg/ml y las soluciones de control

<i>Sustancia (I)</i>	<i>Sustancia (J)</i>	<i>Diferencia de medias (I-J)</i>	<i>P</i>
EERO 50 mg/ml	clorhexidina 0.12 %	1,43	1,00
	agua destilada	12,00	0,00
clorhexidina 0.12 %	EERO 50 mg/ml	-1,43	1,00
	agua destilada	10,56	0,00
agua destilada	EERO 50 mg/ml	-12,00	0,00
	clorhexidina 0.12 %	-10,56	0,00

EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*

La prueba de Bonferroni, demuestran la comparación múltiple entre el EERO de 50 mg/ml, clorhexidina 0,12 %, y agua destilada. (Cuadro 03.)

En la comparación por pares entre el EERO de 50 mg/ml y clorhexidina 0,12 % ($p > 0.05$); por tanto si tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 1,43 mm a favor del EERO de 50 mg/ml.

En la comparación por pares entre el EERO de 50 mg/ml y el agua destilada ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 12 mm a favor del EERO de 50 mg/ml

Cuadro N° 06: Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EERO de 75 mg/ml y las soluciones de control

<i>Sustancia (I)</i>	<i>Sustancia (J)</i>	<i>Diferencia de medias (I-J)</i>	<i>P</i>
EERO 75 mg/ml	clorhexidina 0.12 %	5,00	0,00
	agua destilada	15,56	0,00
clorhexidina 0.12 %	EERO 75 mg/ml	-5,00	0,00
	agua destilada	10,56	0,00
agua destilada	EERO 75 mg/ml	-15,56	0,00
	clorhexidina 0.12 %	-10,56	0,00

EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*

La prueba de Bonferroni, demuestran la comparación múltiple entre el EERO de 75 mg/ml, clorhexidina 0,12 %, y agua destilada. (Cuadro 04.)

En la comparación por pares entre el EERO de 75 mg/ml y clorhexidina 0,12 % ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 5,00 mm a favor del EERO de 75 mg/ml.

En la comparación por pares entre el EERO de 75 mg/ml y el agua destilada ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 15,56 mm a favor del EERO de 75 mg/ml

VI. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, los fitofármacos han asumido un papel importante como medio terapéutico alternativo en la odontología a través de sus propiedades antimicrobianas contra microorganismos que producen patologías orales, especialmente contra los que producen la caries dental y enfermedades periodontales. En estudios realizados con fitofármacos para comprobar una eventual actividad antibacteriana, se emplea métodos de difusión en agar con discos, pocillos, métodos de diluciones en caldo o en agar. El método de difusión en pocillos consiste en realizar pocillos 5 mm de diámetro en el agar luego se coloca el extracto vegetal sobre los pocillos y se incuba a 37° C por 24 horas. Al hacer la lectura, en caso de actividad, se observa halos de inhibición que se miden con un calibrador. El efecto antibacteriano se consideró en función al diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (+) de 9 a 14 mm; sensibilidad media (++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (+++) si fue igual o superior a 20 mm.⁵⁰

En el presente estudio se ha determinado la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* contra microorganismos presentes en la flora salival. Nuestros resultados demostraron que los microorganismos presentes en la flora salival, son susceptibles a la acción del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*, con halos de inhibición del EERO de 25 mg/ml se obtuvo halos de inhibición de 12.47 mm de diámetro como promedio, mientras que a una concentración del EERO de 50 mg/ml se obtuvo halos de inhibición de 17 mm de diámetro, a la concentración del EERO de 75 mg/ml se obtuvo halos de inhibición de 20,56 mm de diámetro; estadísticamente se encontró diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos. En relación al control positivo (clorhexidina al 0,12 %), se observa que también inhibió el crecimiento de la flora salival, con un halo de inhibición en promedio

de 15,56 mm; mientras que para el control negativo (agua destilada), no se encontraron ningún efecto antibacteriano con halo de crecimiento 5 mm.

Abreu, m. y col. (2012). Evaluaron “*in vitro*” las actividades bacteriostáticas y bactericidas del *Rosmarinus officinalis* (romero), en concentraciones que varían entre 100 y 0,78 mg/ml. La lectura se realizó después de 24 horas por el método visual comprobando que el romero mostró actividades bactericidas y bacteriostáticas a una (MIC) de 0,78 mg/ml; contra los *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*.¹⁶

Dalirsani, z. y col. (2011). Evaluaron “*in vitro*” los efectos antimicrobianos del extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) contra *Streptococcus mutans*, y se comparó con clorhexidina al 0.12 % que utilizaron como control positivo. Para dicho trabajo se utilizó 30 gr de *Rosmarinus officinalis* (romero). 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.¹⁸ Estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestro estudio, que se aproximan a los halos de inhibición del EERO de 25 mg/ml que mide en promedio de 12,47 mm. Similar a los resultados que obtuvieron Monroy, a. y col. (2009). En la que valoraron “*in vitro*” la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*. Las concentraciones que se utilizaron fueron de 0.6 a 1.4 mg/ml; los resultados de la evaluación inhibieron el crecimiento de los microorganismos patógenos en rangos que van de 0.8- 1.2 mg/ml, la (CIM) para el romero fue 1.2 mg/ml.²⁴

Los resultados que obtuvimos en nuestro estudio se aproximan mas a los resultados obtenidos por Ardila, m. y col. (2009). Que 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 ug/ml. Contra *Clostridium perfringens*; el extracto de romero presento una inhibición de 14,4 mm. De diámetro en el crecimiento bacteriano, casi semejante a la vancomicina 14.5 mm. Que fue

utilizado como control positivo.²⁶ estos resultados concuerdan también con los resultados de Silva, m. y col. (2008). Que determinaron la actividad antimicrobiana y antiadherente “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a diluciones que varían de: 1:1 a 1:512 y clorhexidina al 0,12 %, contra cepas estandarizadas de: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* y *Lactobacillus casei*; los resultados demostraron que todas la cepas fueron sensibles al extracto de romero, excepto *Streptococcus mitis*. Los halos de inhibición formados varían de 11 a 18 mm. En las diluciones que van de 1:1 a 1:4; mientras que con la clorhexidina al 0,12 % halos de inhibición fueron de 10 a 24 mm. En diluciones que van de 1:1 a 1:64; además se observó que el romero presenta una actividad antiadherente hasta una concentración que va desde 1:1 a 1:18, mientras que la clorhexidina al 0.12 % llega hasta 1: 32 de actividad antiadherencia.¹² Estos resultados también concuerdan con los encontrados por Alves, m. (2008). Que 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. Casi similar a la clorhexidina al 0,12 %, que tuvieron halos de inhibición de 11 a 18 mm.¹³

En la presente investigación se encontraron halos de inhibición mayores a 9,5 mm con diámetros promedios que varían entre 12,47 a 20,56 mm y se observa que los diámetros de los halos aumentan según aumente la concentración del extracto de romero, se encontró como máximo halo de inhibición 32 mm; estos resultados se decidió comparar con un control positivo clorhexidina al 0.12% que generalmente se usa como antiséptico oral, y un control negativo agua destilada,

encontrándose que los halos de inhibición obtenidos por EERO de 50 mg/ml y 75 mg/ml, fueron mayores que los obtenidos por los grupos controles clorhexidina 0.12% y agua destilada. Los resultados de este estudio son prometedores, ya que los microorganismos analizados son importantes en la etiología de las caries y enfermedades periodontales. También muestran la importancia de las aplicaciones terapéuticas del *Rosmarinus officinalis* (romero) como método alternativo y su bajo costo en la prevención de las patologías orales. De esta manera pasaría a formar parte del arsenal en el uso de las plantas medicinales en odontología, ya que sería una alternativa económica y fácil acceso para la población. Lo que se busca actualmente, y en la mayoría de los casos, es validar el conocimiento científico en el uso adecuado de las plantas.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano sobre la flora bacteriana salival. Los valores de los halos de inhibición se encuentran entre los valores límite y sumamente sensible: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (+) de 9 a 14 mm; sensibilidad media (++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (+++) si fue igual o superior a 20 mm.
- A medida que aumenta la concentración del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (de 25 mg/ml a 75 mg/ml) se obtiene un mayor diámetro del halo de inhibición.
- El efecto inhibitorio obtenido por la concentración del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* de 25 mg/ml, es de menor diámetro que el obtenido por el grupo control positivo la clorhexidina 0,12 % y mayor que el grupo control negativo el agua destilada.
- El efecto inhibitorio obtenido por las concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* de 50 mg/ml y 75 mg/ml, es de mayor diámetro que los grupos control: la clorhexidina 0,12 % y agua destilada.
- Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml) tienen una diferencia estadísticamente significativa entre ellas y con los grupos control Clorhexidina 0.12% y agua destilada.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios que demuestren las propiedades de las plantas medicinales para que tengan un respaldo científico y puedan utilizarse como posible medicación en la terapéutica clínica odontológica.
- Realizar estudios del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas bacterianas que producen patologías en la cavidad bucal.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*
- Realizar estudios *in vivo* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* a fin de verificar si con los resultados *in vitro* son similares.
- Ampliar la investigación acerca de formulaciones de pastas y colutorios dentales con extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

IX. RESÚMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a concentraciones de: 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml contra microorganismos frecuentes en la flora salival y compararlos con el control positivo la clorhexidina 0,12 % y control negativo el agua destilada. Se seleccionaron 22 pacientes que acudieron a atenderse en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se procedió a tomar la muestra de saliva no estimulada, luego se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Se sembró en el medio Agar Tripticasa soya, se utilizó el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó durante 24h y 48h a 37° C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. Los resultados que se obtuvieron fueron halos de inhibición en promedio de 12,47 mm para 25 mg/ml, 17 mm para 50 mg/ml, 20,56 para 75 mg/ml, 15,56 para la clorhexidina 0,12 %, 5 mm para el agua destilada. Comprobándose que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero), presenta una efectividad antibacteriana sobre flora salival.

PALABRAS CLAVES: Flora salival, extracto etanólico, *Rosmarinus officinalis*, clorhexidina.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the in vitro antibacterial effectiveness of the ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) at concentrations of 25 mg / ml, 50 mg / ml and 75 mg / ml against common microorganisms flora compared to the salivary and chlorhexidine positive control and negative control 0.12% distilled water. We selected 22 patients who attended the clinic care from the Faculty of Dentistry of San Marcos. He proceeded to take the sample of unstimulated saliva, then took the samples to the microbiology laboratory for processing. Were seeded in Trypticase Soy Agar was used well diffusion method with the experimental solutions and incubated for 24h and 48h at 37 ° C, and then proceed to read the inhibition zone diameters. The results obtained were averaged halos of inhibition of 12.47 mm to 25 mg / ml, 17 mm to 50 mg / ml, 20.56 to 75 mg / ml, 15.56 to 0.12% chlorhexidine, 5 mm for distilled water. Proving that the ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* (rosemary), has effective antibacterial saliva on flora.

KEYWORDS: Flora salivary ethanol extract, *Rosmarinus officinalis*, chlorhexidine.

X. 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 (3)
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 (1).
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 (2): 80-85.
8. Marchiori F. *Rosmarinus officinalis* Linn. Monografía de Conclusão do Curso de Fitomedicina. 32 f. Associação Argentina de Fitomedicina. Fundação Herbarium. 2004.
9. Tránsito M. El romero Planta aromática con efectos antioxidantes. 2008 jul/ago; 27 (7): 60-64.
10. López G. Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas. 2da. Ed. Mundi-prensa libros 2006

11. Argueta A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 1994.
12. Silva M, Vieira J Sheila J, Vieira M, Guedes M. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis linn.* (alecrim) sobre microorganismos criogénicos. Arquivos em Odontología 2008 abr/jun; 44 (2).
13. Alves M. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de un dentífrico basado en extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis linn.* (romero) sobre cepas de *s. mutans s. aureus* y *I. casei*. Tesis de maestría en Odontología Recife-pe, Universidad Federal de Pernambuco; 2008.
14. Lock De Ugaz O. Investigación Fito química, métodos en el estudio de productos naturales. 2da ed. Lima – Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994: 25
15. Andean Products. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los Andes. Informe Roadmapping. Perú; 2006.
16. Abreu M, Brindeiro D, Dantas I, Wanderley Y, Wilney W. Efeito antimicrobiano de tinturas de productos naturais sobre bacterias da cárie Dentária. Rev. Bras Promoç Saúde 2012 abr/jun; 25(2): 197-201.
17. 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
18. 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 with chlorhexidine. Journal of applied sciences. 2011; 11 (5): 878-882
19. 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

20. Castro R, Lima E. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Cândida*. Rev. Bras. Pl. Med. 2011; 13 (2): 203-208.
21. Battagin J. Cinética enzimática e efeito de extratos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de *streptococcus mutans*. programa de pós-graduação *stricto sensu* em ciências da saúde da Universidade São Francisco Bragança Paulista; 2010
22. Volcao I, 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
23. 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.
24. Monroy A, Garcia I, Totosaus A. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos etanólicos de romero y chile ancho y su aplicación en un batido carnico. NACAMEH. 2009; 3 (1): 21- 32.
25. 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.
26. 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.
27. Barni M, Fontanals A, Moreno S. Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. contra *Staphylococcus aureus*

- 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.
28. Rozman T, Jersek B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. Acta Agrícola Slovenia, 2009; 93(1): 51-58.
29. Hentz S, Santin N. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. Evidência, Joaçaba. 2007; 7 (2): 93-100.
30. Genena K, Hense H, Smania J, Souza M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 2007; 28(2): 463-469.
31. Gontijo C, Silva I, Correa M, Pizzolitto M, Bauab T. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006 jul/set; 42 (3): 395-404
32. Rau U, Wurglies M, Paulke A, Zitzkowsi J, Meid D, Back A, Dingerman T. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpeno compounds of the labiale herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Plant Medicinale*, 2006; 72(10): 881- 885.
33. Segura S, Torres J. Historia de las plantas en el mundo antiguo. Madrid: Consejo superior de invertigaciones científicas, 2009: 344
34. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos, 2a. ed., Corpus, Buenos Aires, 2004: 545.
35. Muñoz L. Estudio taxonómico, cronológico y autoecologico de las plantas medicinales españolas. 1ra ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 2002

36. Marzocca A. Vademécum de malezas medicinales de la Argentina: indígenas y exóticas. Argentina: editorial Orientación grafica, 1997: 347-352
37. Hernández R, Gally M. Plantas medicinales. Colombia: editorial Pax México, 1981
38. Tovar O. Plantas medicinales del valle del Mantaro. Lima, Perú: concytrc, 2001.
39. Al-Sereiti M, Abu-Amer P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biology, 1999; 37(2): 124-30.
40. Guerrero C, Rodriguez H, Brito J. Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. effect of harvesting dates growing media and fertilizers. Greece. 2007; 24(2): 65-70.
41. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12: 564-582.
42. Peyman S, Reza F. Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L., by hydrodistillation-head space solvent microextraction. Journal of Flavour and Fragrance, 2007; 10(5): 1002-1007.
43. Kuklinski C. Farmacognasia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ra ed. Barcelona–España: Omega. 2000:112-114.
44. Arteché A, Vanaclocha B, Güenechea J. Fitoterapia 3ra ed. Vademécum de prescripción. Plantas medicinales. Barcelona: Masson; 1998.
45. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2da ed. Editorial Acribia. 2001.
46. Genena K, Hense H, Smania J, Souza M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 2008 ;28(2): 463-469.

47. Centeno S, Calva M. Antifungal activity of extract of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* on *Aspergillus flavus* and *A. ochraeus*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2010; 13(9): 452-455.
48. Cueva A. Enciclopedia plantas medicinales: Propiedades y usos. 1ra ed. Lima-Perú: A.F.A. 2003: 35.
49. Greulach A, Adams J. Las plantas: Introducción a la botánica moderna. 3ra ed. México DF: LIMUSA. 2000: 60.
50. 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.
51. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales: Revisión de la literatura y perspectiva actual. Avances en Periodoncia 2006; 18(1): 31-59.
52. Hancock E, Newell D. Antimicrobianos en la Práctica Periodontal. Rev. Clínicas Odontológicas de Norteamérica. México, 1994; 4 (9): 702-703.
53. Herrera D, Roldan S, Santa Cruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Diferencias en la actividad antimicrobiana de cuatro colutorios en diferentes formulaciones de clorhexidina al 0,12%: un estudio de contacto in vitro y recuentos bacterianos en saliva. Journal of Clinical Periodontology 2003; 30: 307-314
54. Fordal O y Turnbull R. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. JADA 1986; 112: 863-869.
55. Okano M, Nomura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. Arch Dermatol, 1989; 125: 50-52.
56. Ayala O. Eficacia del enjuagatorio de clorhexidina como coadyuvante en la prevención de complicaciones postoperatorias, en cirugías de terceras molares inferiores. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista, UNMSM, 2007

57. Ross A, Philip W, Holbrook P. Microbiología bucal y clínica. Primera Edición, México, Editorial Científica PLM, S.A. C.V., 1985.
58. Negroni M. Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica. ed. Buenos Aires – Argentina: Panamericana. 2009:225-245.
59. Bordoni N, Escobar A, Castillo R. Odontología Pediátrica. La salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual. Ed. Médica Panamericana, 2010
60. Liébana J. Microbiología oral. Interamericana, McGraw-Hill, 1995
61. Liébana J. Microbiología oral. 2da ed. Barcelona – España: Mc GRAW – HILL Interamericana. 2002: 515 - 523.
62. Nolte, W., Microbiología Odontológica. 4ta ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1996.
63. Nauntofte B, Tenevuo J, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E. Eds. Dental Caries; The disease and its clinical management. Oxford. Blackwell Munksgard. 2003: 7- 29.
64. Tenovuo J. Antimicrobial agents in saliva – protection for the whole body. J Dent Research. 2002; 81(12): 807-809.
65. Banderas J, Gonzales M, Sanchez M, Millan E, López A. Flujo y concentracion de proteinas en saliva total humana. Rev. Salud Pública Mex. 1997; 39(5): 433-441

XI. ANEXOS

ANEXO 01: cuadros de consistencia

CLASIFICACION TAXONOMICA DEL *ROSMARINUS OFFICINALIS*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

CONSTANCIA N°. 312-USM-2012

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

La muestra vegetal (Tallo, con hojas y flor), recibida de **Taylor Pitágoras PURCA PEÑA**, de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Rosmarinus officinalis L.***; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Rosmarinus*

ESPECIE: *Rosmarinus officinalis L.*

Nombre vulgar: "Romero".

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

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

Fecha, 05 de Noviembre de 2012


Dra. HAYDÉE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO DE SAN MARCOS (USM)
JEFE

TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Metabolitos	Reacción	Resultado
Antraquinonas	Bortranger	(-)
Fenoles	Cloruro férrico	(+++)
Flavonoides	Shinoda	(-)
Alcaloides	Dragendorff	(+++)
	Mayer	(+)
	Popoff	(+)
	Bertrand	(+)
	bouchardart	(+)
Taninos	gelatina	(-)
Esteroides	Lieberman-Buchard	(+++)
Saponinas	Espuma	(+++)
Azucares reductores	Fehling A	(+++)
	Fehling B	(+++)
	Nitrato de plata amoniacal	
Grupo carbonilo		(+++)
Aminoácidos libres	Ninhidrina	(++)

Leyenda:

- (+++) Abundante
- (++) Bastante
- (+) Regular
- (-) No presenta

ANEXO 02: Instrumentos de recolección de datos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la investigación: Efectividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival

Investigador: Purca Peña Taylor Pitágoras

Institución: Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Objetivo de la investigación: Determinar el efecto antibacteriano “*in vitro*” en diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival.

Procedimientos que se seguirán durante la investigación

Usted será uno de los 22 pacientes de la clínica de la facultad de Odontología de la U.N.M.S.M. cuya muestra salival será recolectada en vasos estériles a razón de alrededor de 20 ml y se procesarán dentro de un máximo de 60 minutos subsiguientes en tubos de ensayo estériles hasta obtener la concentración a la escala N° 0,5 de Mac Farland. Después de ello, dichas muestras se sembrarán en placas de Agar Trypticase Soya (TSA).

Luego mediante el método de pocillos que se confeccionaran sobre las placas, se colocaran las diferentes concentraciones del extracto de romero. Complementariamente se utilizará la clorhexidina al 0,2 % como control positivo y agua destilada como control negativo.

Las placas se incubaran por 24 – 48 horas en aerobiosis por 37°C para su posterior lectura y medición de sus halos de inhibición.

Confidencialidad:

La ficha de datos en la cual se identifica a usted y el consentimiento informado que firmó serán revisados por el investigador. Los resultados de esta investigación podrán presentarse para su exposición, sin embargo, su identidad no será divulgada en tales presentaciones.

Consentimiento:

He leído y conversado con el investigador sobre esta hoja de información y formato de consentimiento y entiendo el contenido. Por tanto doy consentimiento voluntario para participar en la investigación.

_____ DNI: _____ Fecha: _____
Nombres y Apellidos **Firma**

ANEXO 03: Gráficos

FLUXOGRAMA: Siembra de la muestra

Muestra: 3 ml de
saliva no estimulada

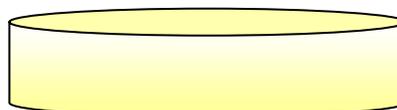


5 ml

Suero fisiológico a un nivel
turbidez de 0.5 Mc Farland

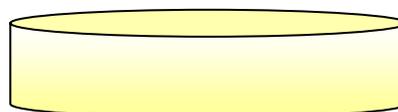


Siembra por diseminación TSA
alícuotas 100 µL



Realizar los pocillos mediante sacabocado

Colocación de las sustancias
en los pocillos



Tiempo: 24 horas a 37 °C se colocó en un recipiente, incorporándole luego una vela encendida y cerrándola herméticamente.

Luego lectura y medida de los halos de inhibición.

ANEXO 04: Tabla de interpretación de datos

MEDIDA DE HALO DE INHIBICION EN LA PLACA TSA

Flora salival	Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)			Control positivo Clorhexidina al 0,12 %	Control negativo agua destilada
	25mg/ml	50mg/ml	75mg/ml		
Cultivo N° 01	13.5	14	18	16	5
Cultivo N° 02	9.5	12.5	18	13.5	5
Cultivo N° 03	11.5	16	18	16	5
Cultivo N° 04	11.5	15.5	19	15	5
Cultivo N° 05	10	14.5	18.5	14.5	5
Cultivo N° 06	10.5	25	28	15	5
Cultivo N° 07	13	15	23	15	5
Cultivo N° 08	10.5	13	15	15	5
Cultivo N° 09	11	16	17.5	15.5	5
Cultivo N° 10	11	14.5	18	15.5	5
Cultivo N° 11	11	15	23.5	15.5	5
Cultivo N° 12	12.5	17.5	23	17	5
Cultivo N° 13	13	16.5	20	16	5
Cultivo N° 14	24	29	32	16	5
Cultivo N° 15	9.5	25	27	15	5
Cultivo N° 16	11	14.5	16	16.5	5
Cultivo N° 17	11	15.5	16.5	16.5	5
Cultivo N° 18	12	15	20.5	16	5
Cultivo N° 19	22.5	27	29	15	5
Cultivo N° 20	12.5	14	17	17	5
Cultivo N° 21	11	14	17	15	5
Cultivo N° 22	11.5	13	18	16	5

ANEXO 05: Fotografías

MATERIALES Y MUESTRAS



Fig. 1. Tallos de *Rosmarinus officinalis*

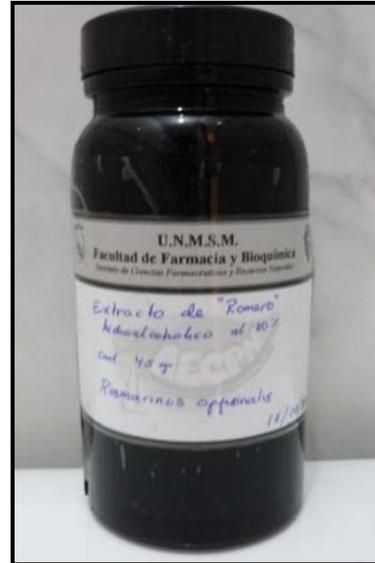


Fig. 2. Extracto de *Rosmarinus officinalis*

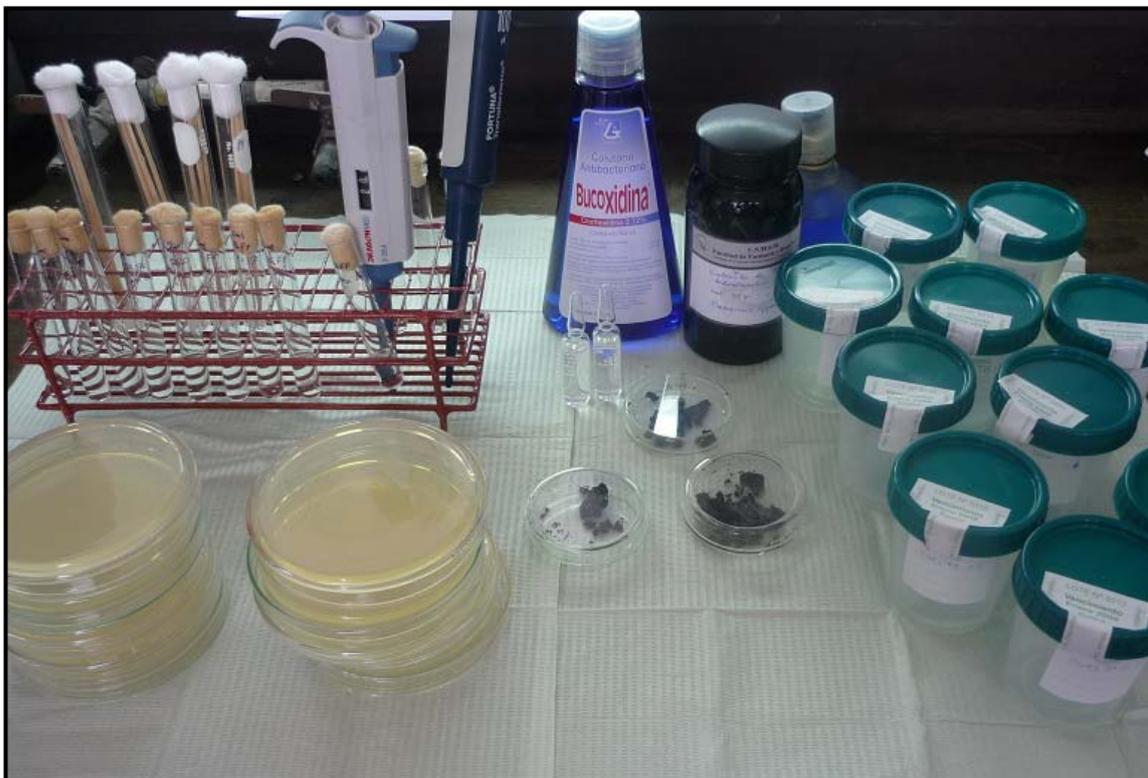


Fig. 3. Materiales utilizados en el laboratorio de Microbiología

PROCEDIMIENTO



Fig. 4. Separando las hojas del tallo.



Fig. 5. Muestra para la identificación.



Fig. 6. Maceración de las hojas en solución hidroalcohólica al 80% (etanol)



Fig. 7. Obtención del extracto puro.



Fig. 8. Toma de la muestra de saliva no estimulada



Fig.9. Dilución del extracto de *Rosmarinus officinalis* en concentraciones de 75, 50 y 25 mg/ml

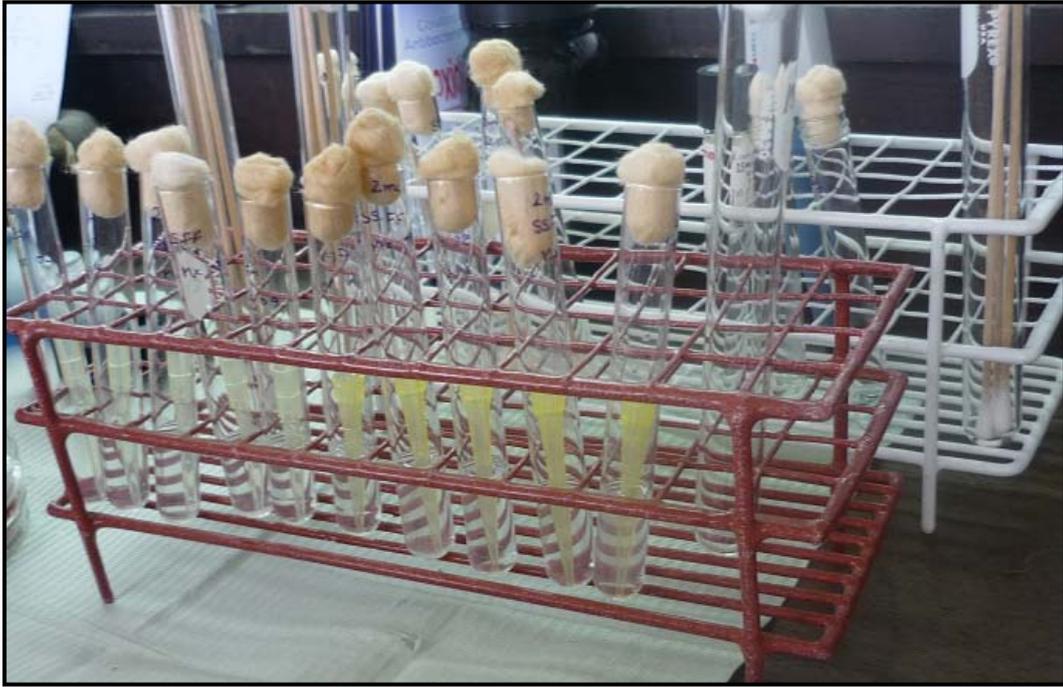


Fig.10. Rotulado de los tubos de ensayo con sus respectivos muestras

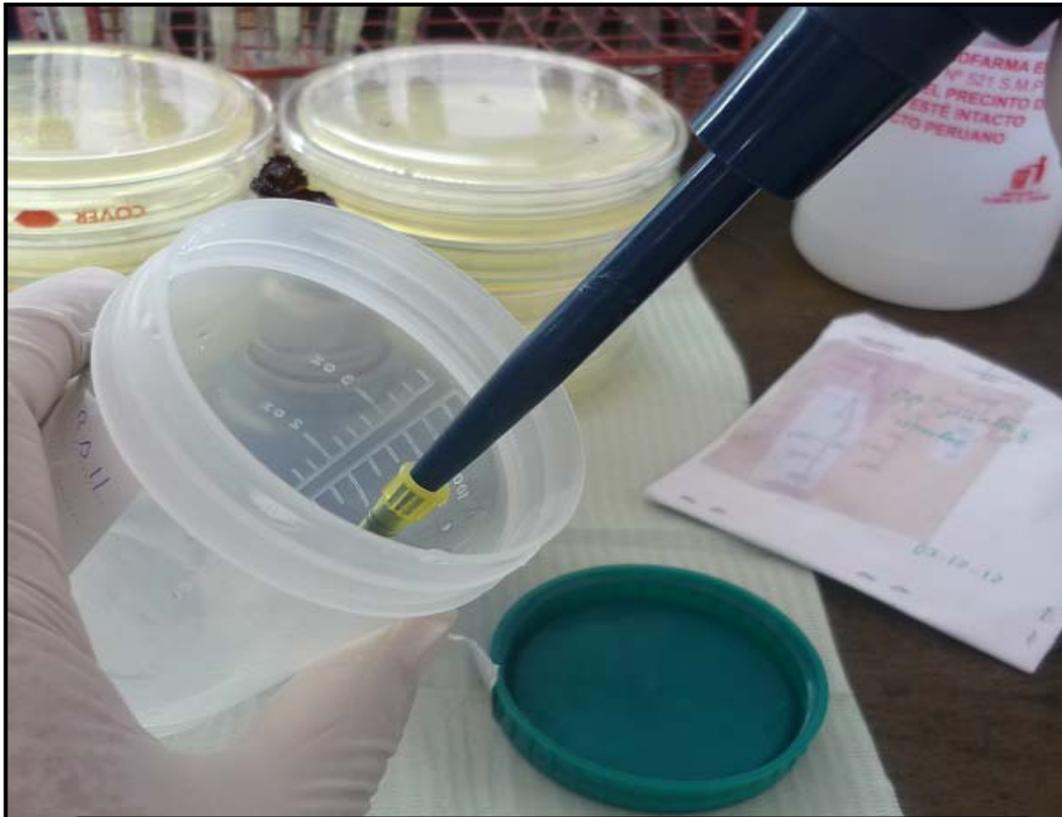


Fig. 11. Dilución de la muestra de saliva en 2ml de suero fisiológico



Fig. 12. Estandarizacion con la escala de turbidez del tubo N° 0.5 del Nefelómetro de McFarland

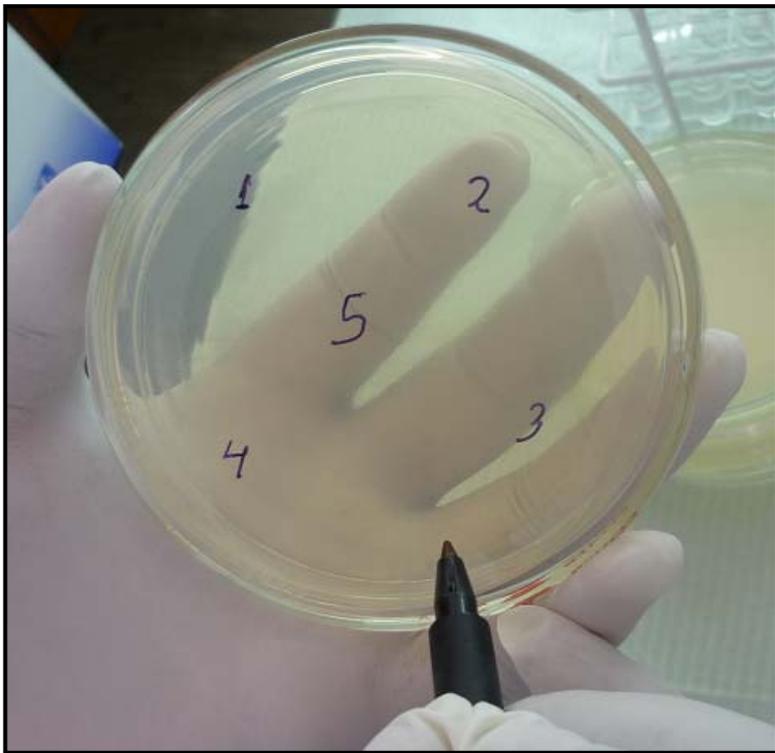


Fig. 13. Rotulado de las placas petri para colocar los extractos y sustancias control

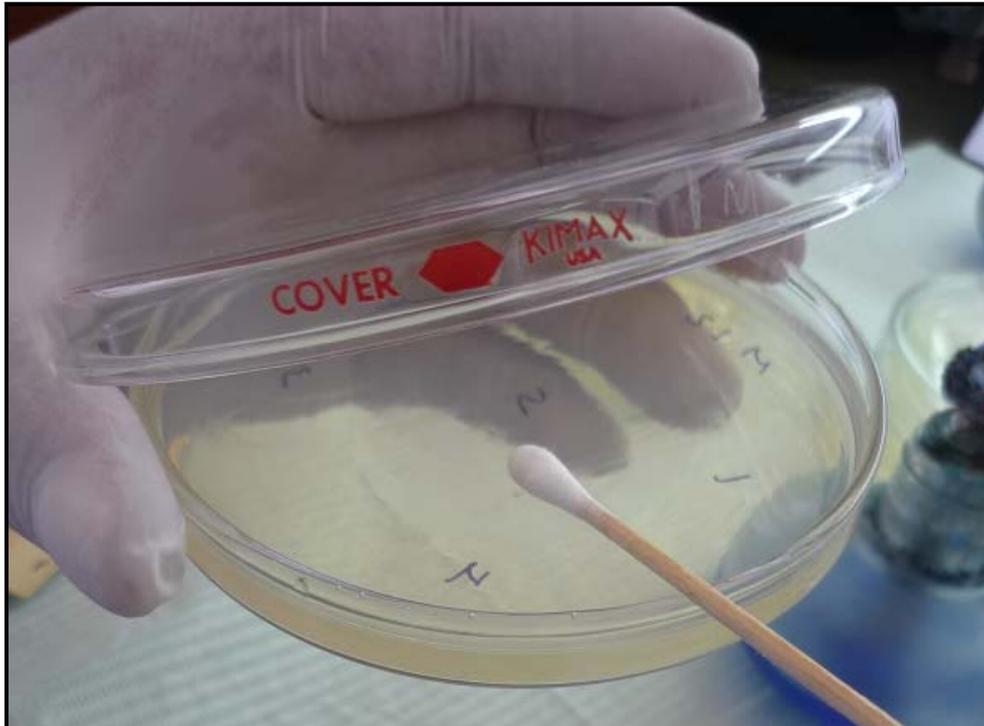


Fig.14. Siembra de la muestra salival mediante hisopado directo.



Fig.15. Confección de los pocillos donde se colocaran las muestras, cada pocillo tiene una capacidad de 50ul y un diámetro de 5mm.

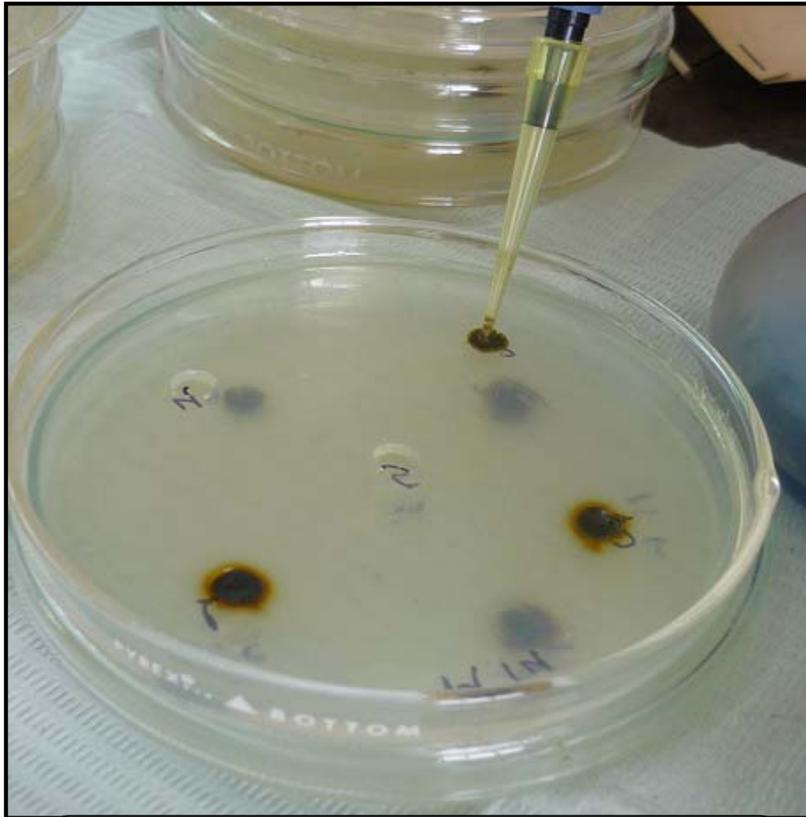


Fig. 16. Pipeteado de las sustancias en cada pocillo que les corresponde



Fig.17. Colocación de las placas petri en un recipiente, incorporándole dos velas encendidas (método de la vela) para después llevarlo a la incubadora.

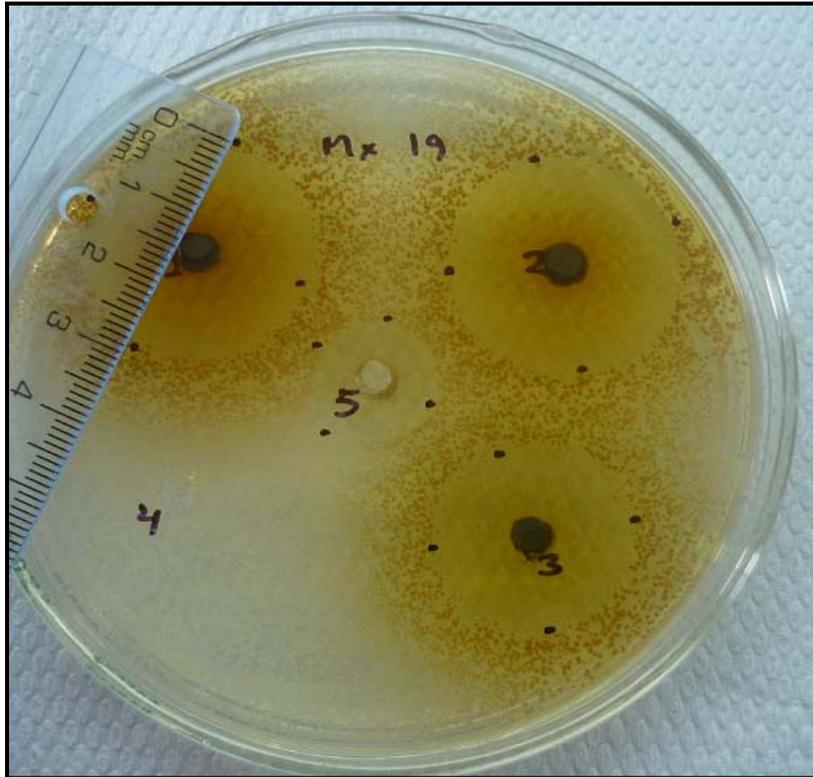


Fig.18.A las 48 horas de haber realizado la siembra se procedió a hacer las lecturas y el llenado de la ficha de recolección, tomando en cuenta: la identificación de la muestra, concentración y medida en milímetros del halo de inhibición formado.



Fig.19. Resultados: se observan halos de inhibición alrededor de cada concentración de *R. officinalis*, el control positivo (clorhexidina al 0,12 %) y en el control negativo (agua destilada) no se observa ningún halo de inhibición.

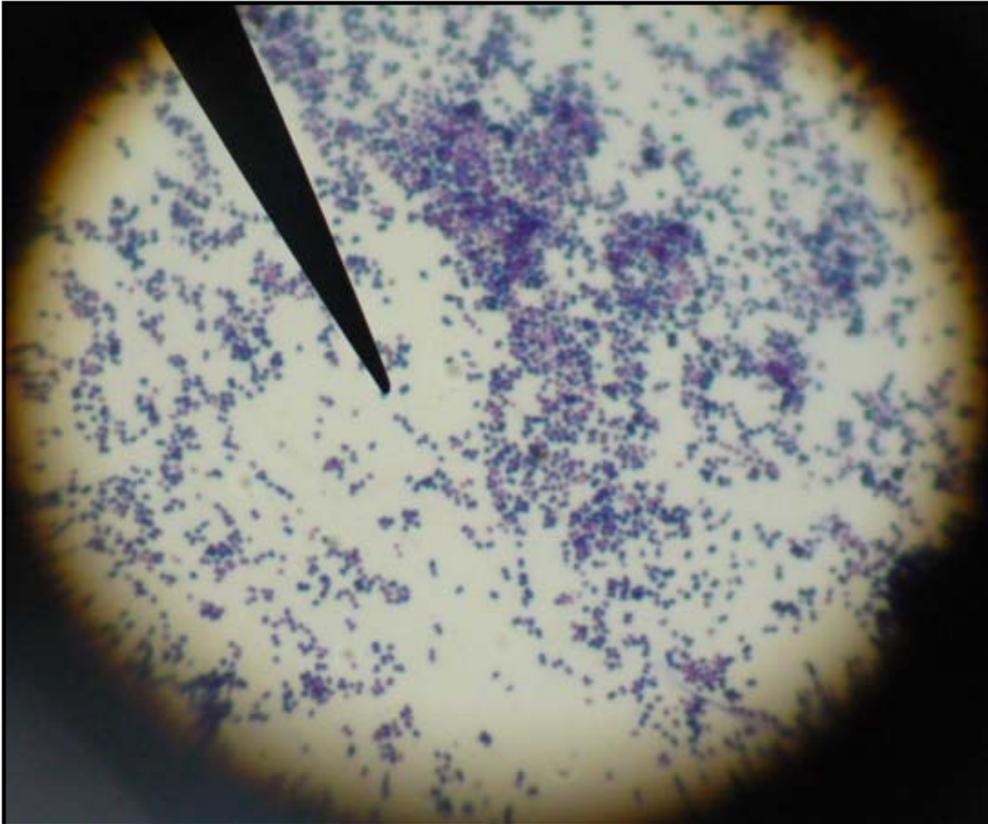


Fig. 20. En la coloración Gram al microscopio óptico se observa en la gran mayoría cocos Gram positivos

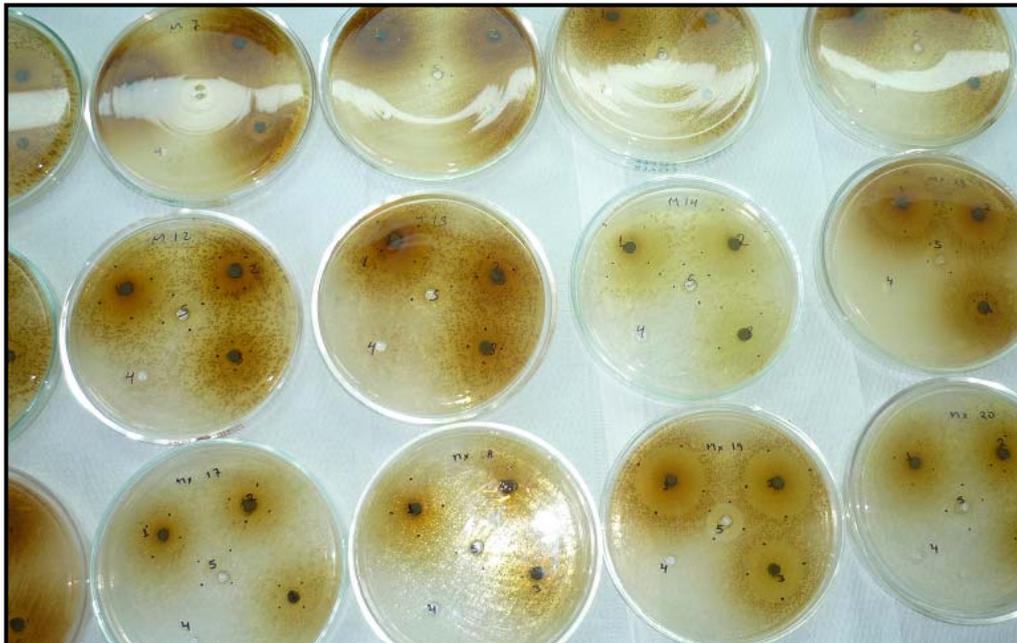


Fig. 21. En los resultados se observa los halos de inhibición alrededor de cada sustancia