



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

COMPARACIÓN IN VITRO DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS
HIDROETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)
Y *Foeniculum vulgare* (HINOJO) FRENTE A CEPAS DE
Streptococcus mutans ATCC 25175, TRUJILLO - 2018

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

AUTOR:

QUIPUZCO CRUZ EDER SERGIO

ASESOR:

MGTR. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM

TRUJILLO – PERÚ

2019

1. Título

COMPARACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis*
(ROMERO) Y *Foeniculum vulgare* (HINOJO) FRENTE A CEPAS DE
Streptococcus mutans ATCC 25175, TRUJILLO - 2018

2. Equipo de trabajo

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Quipuzco Cruz Eder Sergio

ASESOR

Mgr. Vásquez Plasencia César Abraham

3. Firma del jurado y asesor

Dr. AGUIRRE SIANCAS ELÍAS ERNESTO
PRESIDENTE

Mgtr. MORÓN CABRERA EDWAR RICHARD
MIEMBRO

Mgtr. PAIRAZAMÁN GARCÍA JUAN LUIS
MIEMBRO

Mgtr. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM
ASESOR

4. Agradecimiento

A Dios, por el regalo de la vida y por no dejarme solo en mis adversidades, por iluminar mi camino y llenarme de bendiciones para alcanzar mis metas propuestas.

A mi Familia, por estar conmigo en cada momento, por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica.

A la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, por recibirme en su centro de estudios.

A la Dra. Tammy Honores Solano y al Dr. César Abraham Vásquez Plasencia por su orientación, dedicación y tiempo brindado como apoyo para la culminación del presente trabajo de investigación.

5. Dedicatoria

A Dios por iluminarme y acompañarme siempre a lo largo de mi carrera, por brindarme sosiego y fortaleza en todo el trayecto de esta aventura llamada vida

A Manuel y Mariana, mis padres, por su constante apoyo y empuje para lograr mis metas cada día.

A Diana, Mirla y Wiler, mis hermanos, por su cariño y apoyo, por llenar mi vida de constantes muestras de cariño. Los quiero.

6. RESUMEN

La investigación comparó el efecto antibacteriano entre el extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se prepararon extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis*; *Foeniculum vulgare* y extracto mixto de ambas plantas a concentraciones del 50% y 75%. La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se reactivaron en Caldo Cerebro Corazón. La evaluación del efecto antibacteriano se realizó mediante 10 repeticiones por concentración usando método Kirby Bauer, de difusión en agar, utilizando discos de papel filtro colocados en placas conteniendo Agar Müeller Hinton inoculadas con *S. mutans*. Se emplearon como control positivo a digluconato de clorhexidina al 0.12% y control negativo a etanol al 70%. Se midieron los diámetros en (mm) los halos de inhibición alrededor de cada disco utilizando una regla milimetrada vernier digital. El diámetro promedio fue de 23.78mm al 50% y de 27.88mm al 75% para Romero; el diámetro promedio fue de 19.83mm al 50% y de 23.14mm al 75% para Hinojo, el diámetro promedio fue de 26,76mm al 50% y de 30.21mm al 75% para (Romero + hinojo), para la clorhexidina al 0.12% el diámetro promedio fue de 25.85mm, y para etanol al 70% el diámetro promedio fue de 9.10mm. La prueba ANOVA mostró que existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones de los extractos. Se concluye que el extracto mixto de romero e hinojo al 75% presentó el mayor efecto antibacteriano frente a *S. mutans*.

Palabras clave: antibacterianos; clorhexidina; *Foeniculum* (Hinojo); *Rosmarinus* (Romero); *Streptococcus*.

7. ABSTRACT

The research compared the antibacterial effect between the hydroethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* and *Foeniculum vulgare* against strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Hydro ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* were prepared; *Foeniculum vulgare* and mixed extract of both plants at concentrations of 50% and 75%. The strain of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was reactivated in Brain Heart Broth. The evaluation of the antibacterial effect was carried out by means of 10 repetitions by concentration using the Kirby Bauer method, of diffusion in agar, using discs of filter paper placed in plates containing Müeller Hinton agar inoculated with *S. mutans*. Chlorhexidine digluconate at 0.12% and negative control at 70% ethanol were used as a positive control. The diameters in (mm) the inhibition zones around each disc were measured using a digital vernier millimeter rule. The average diameter was 23.78mm at 50% and 27.88mm at 75% for Romero; the average diameter was 19.83mm at 50% and 23.14mm at 75% for fennel, the average diameter was 26.76mm at 50% and from 30.21mm at 75% for (rosemary + fennel), for chlorhexidine at 0.12 The average diameter was 25.85mm, and for 70% ethanol the average diameter was 9.10mm. The ANOVA test showed that there is a significant statistical difference between the concentrations of the extracts. It is concluded that the mixed extract of rosemary and fennel at 75% presented the highest antibacterial effect against *S. mutans*.

Key words: antibacterials; chlohexidine; *Foeniculum* (Hinojo);

Rosmarinus (Romero); *Streptococcus*.

9. Contenido

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Hoja de agradecimiento.....	v
5. Hoja de dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. Abstract.....	viii
8. Contenido	ix
9. Índice de tablas.....	x
10. Índice de gráficos.....	xi
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	4
III. Hipótesis	21
IV. Metodología	22
4.1. Diseño de la investigación.....	22
4.2. Población y muestra	22
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores ...	24
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	25
4.5. Plan de análisis	31
4.6. Matriz de consistencia.....	32
4.7. Principios éticos	33
V. Resultados	34
5.1 Resultados	34
5.2. Análisis de Resultados	36
VI. Conclusiones	40
Aspectos complementarios.....	41
Referencias Bibliográficas	42
Anexos.....	54

10. Índice de tablas

Tabla 1. <i>Comparación, in vitro, del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos de Rosmarinus officinalis (romero) y Foeniculum vulgare (hinojo) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.....</i>	34
Tabla 2. <i>Subgrupos del efecto antibacteriano, entre los extractos hidroetanólicos de Rosmarinus officinalis (romero) y Foeniculum vulgare (hinojo) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC25175.....</i>	35
Tabla 3. <i>Prueba de Normalidad.....</i>	78

11. Índice de gráficos

Gráfico 1. <i>Comparación, in vitro, del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos de Rosmarinus officinalis (romero) y Foeniculum vulgare (hinojo) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.....</i>	79
---	----

I. Introducción

La caries dental se constituye como una de las 3 enfermedades con la mayor prevalencia a nivel mundial alcanzando niveles del 92%¹. En América Latina los valores del índice CPOD fluctúan entre 4.4 y más de 6.5 (cualitativamente se describe como muy alto)², índice que mantiene su rango en nuestro país de manera sectorizada debido a que existen sectores donde se consiguen valores de 2.7, lamentablemente son los valores superiores a 4.4 los que constituyen el promedio.^{2,3}

Son 4 los factores que resaltan en el proceso de formación de la lesión cariosa; así cuando el sustrato y el huésped confluyen en un mismo y suficiente tiempo, brindan el entorno adecuado para que el patógeno, *Streptococcus mutans*, sea capaz de enfermar al órgano dentario a través de la producción de ácidos que desmineralizan al tejido más duro del cuerpo humano hasta perforarlo.^{4,5}

Con el fin de prevenir la instauración de la patología se han sintetizado productos terapéuticos que erradican al patógeno o disminuyen sus niveles hasta limitar su patogenicidad (de manera local y temporal), sin embargo se han reportado diversos efectos adversos de estos, lo que van desde la alteración de la percepción del sabor tras el cepillado, la tinción de los dientes, problemas de descamación epitelial de la mucosa oral hasta la posible generación de resistencia bacteriana por la presencia de compuestos como el triclosán.⁶ De esta forma las últimas investigaciones han apuntado hacia la generación y utilización de novedosos recursos que eliminan estos efectos negativos y aportan los mismo o mejores beneficios que los brindados por los agentes sintéticos.⁷

Se considera como propiedad fundamental para ser considerado como agente cariostático, la capacidad bactericida sobre *Streptococcus mutans*; en este contexto, los productos naturales (extractos de plantas, aceites esenciales y compuestos aislados, y productos marinos) se han propuesto como nuevos agentes terapéuticos al encontrarse esta propiedad en una importante cantidad de éstos, ello con el fin de minimizar los efectos adversos.⁶

Dentro de los productos naturales con actividad antibacteriana en la cavidad oral tenemos al *Rosmarinus officinalis* (romero), que es una especie de planta leñosa perenne, originaria de la región mediterránea, cuyas hojas se usan comúnmente como condimento y también sirven para fines medicinales. Sus principales componentes responsables de las actividades farmacológicas son el 1,8-cineol (52,2%), el alcanfor (15,2%) y el α -pineno (12,4%).³

Otro producto natural de interés es *Foeniculum vulgare* (Hinojo), hierba periódica con potente importancia medicinal perteneciente a la familia Umbelliferae, es utilizado para los problemas digestivos, respiratorios, y dentro de sus propiedades tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.⁴

La investigación sobre el *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* en el área de la odontología es escasa, es por ello que este estudio se traza el siguiente problema ¿Cuál es la diferencia, in vitro, del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?, ello permitirá demostrar la efectividad antibacteriana de la medicina tradicional en la prevención para la preservación de la salud bucal, utilizando los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus oficinales* y *Foeniculum vulgare* como una alternativa, que beneficie a la población en especial de

bajos recursos económicos, contribuyendo así al control de microorganismos patógenos orales en especial al *Streptococcus mutans*. Por ende, nuestro estudio es de tipo cuantitativo, de nivel explicativo y sigue un diseño experimental, prospectivo, transversal y analítico. Este estudio encontró que existió gran diferencia significativa entre ellos, siendo mayor el halo de (Romero + Hinojo) al 75% con un promedio de 30,21mm y siendo el mínimo halo de Hinojo al 50% con un promedio de 19.83mm. Se concluye que el extracto mixto de (Romero +Hinojo) al 75% presento el mayor efecto antibacteriano frente a *S. mutans*. Al 50% presento el mismo efecto que el Romero al 75%.

II. Revisión de la literatura

2.1. Antecedentes:

Cueva J⁸. (Perú, 2017) “Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*. Lima 2016” y tuvo como objetivo conocer la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *R. officinalis* (Romero) sobre *S. mutans*, a través de la siembra de la bacteria en 30 placas petri con agar Müller Hinton, usando el método de pozo de 6 mm de diámetro saturado de *R. officinalis* (romero) al 100% y teniendo como control positivo a clorhexidina 0.12 % y agua destilada como control negativo; luego de su incubación se realizó la medición de halo de inhibición a las 72 y 168 horas. El halo fue de 0mm para el agua destilada en ambas mediciones, de 14,3 y 5,1mm para el aceite esencial y de 17,1 y 19,9 para la clorhexidina a las 72 y 168horas, respectivamente. Concluyendo que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) al 100% presenta actividad antimicrobiana “*in vitro*” frente al crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 y 168 horas.

Solano X⁹, et al. (Ecuador, 2016) “Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero)” y tuvo como objetivo determinar la inhibición del efecto antibacteriano *in vitro* de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a cepas de *Streptococcus mutans*, a concentraciones de: extracto acuoso de 1,5% y 3%; extracto oleoso de 50%, teniendo cada uno como control positivo a clorhexidina 0,12% y como control negativo a agua destilada. Se realizaron dos grupos de 15 repeticiones para cada una en cajas petri, valiéndose del método de difusión de disco.

Al realizar la medición del halo de inhibición se encontró que el extracto acuoso de *R. officinalis* (romero) produjo un halo de inhibición de 00mm y el agua destilada produjeron un halo de inhibición de 00mm. El extracto oleoso de *R. officinalis* (romero) produjo una media de 11,93 mm de halo de inhibición versus el control positivo Clorhexidina que presentó una media de 16.13mm. Concluyendo que el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* no presentó actividad antibacteriana “in vitro” en cultivos de *Streptococcus mutans*, mientras que el extracto oleoso presenta acción antibacteriana similar a la de la clorhexidina.

Baca L, Yábar A¹⁰ (Perú, 2016) “Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Cymbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (oregano), *Citrus aurantifolia swingle* (limon) y *Citrus sinensis* (naranja), frente a cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans*, cusco 2016” y tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Foeniculum vulgare* (hinojo) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a concentración de 100% y teniendo como control positivo a Clorhexidina al 0.12%. Los aceites esenciales de dichas plantas se obtuvieron por el método de arrastre a vapor de agua. Se realizaron 3 repeticiones valiéndose del método difusión de disco, tras 24 horas se midió el halo de inhibición para comprobar su acción; trascendió que el aceite esencial de *Foeniculum Vulgare* produce un halo de 15.000mm. Concluyendo que *Foeniculum vulgare* presenta mayor efecto antibacteriano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*.

Rocha R¹¹ (Perú, 2016) “Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175” y tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75% y 100%. Se efectuó la prueba de susceptibilidad, utilizando el método de difusión en discos; en los cuales todos los discos presentaron halo de inhibición, y los tamaños de estos aumentaron directamente proporcional a las concentraciones utilizadas, excepto a las concentraciones de 75% y 100% son iguales. Los halos de inhibición al 5% fue de un promedio de 11.9mm; al 25% fue de un promedio de 17,7mm; al 50% fue de un promedio de 18,23mm; al 75% fue de un promedio de 19.70mm; al 100% fue de un promedio de 19.70mm y como control positivo fue penicilina preclínica con un promedio de 17.35mm. Concluyendo que el aceite de romero a dichas concentraciones presentó efecto antibacteriano in vitro para eliminar *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Castañeda J¹² et al. (Perú, 2016), “Efecto antifúngico del extracto etanólico de las semillas de *Foeniculum vulgare* mill sobre CEPA *Candida albicans* ATCC 10804 in vitro” y tuvo como objetivo evaluar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de la semilla de *Foeniculum vulgare* mill. “hinojo” contra cepa de *Candida albicans* ATCC 10804 in vitro, a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% y teniendo como control a Fluconazol. Se efectuó la prueba de Susceptibilidad, utilizando el método de difusión de discos (Kirby y Bauer); en los cuales todos los discos presentaron halo de inhibición. Los resultados indicaron que el extracto de semillas de *Foeniculum vulgare* al 25% produjo un halo de inhibición con un promedio de 8,45mm; al 50% fue de un promedio de 10,82mm; al 75% fue de un promedio de

12,73mm y al 100% fue de un promedio de 19,45mm y como control fue fluconazol con un promedio de 00.00mm. Se concluye que el extracto etanólico de semillas de *Foeniculum vulgare* presento efecto antifúngico “in vitro” frente al crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10804.

Sosa J¹³ (Perú, 2015) “Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*” y tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* a 25% y 50% sobre *Streptococcus mutans*, teniendo como control positivo a clorhexidina al 0,12% y etanol como control negativo. Para determinar el efecto antibacteriano se sembró la bacteria en placas con Agar Mueller-Hinton usando el método de Kirby-Bauer (disco); en los cuales los discos presentaron halo de inhibición para dichas concentraciones. Los halos de inhibición al 25% fue de un promedio de 19 mm, al 50% fue de un promedio de 24mm y como control positivo fue clorhexidina al 0,12 % con un promedio de 16mm, el cual es semejante al obtenido con el solvente etanol absoluto. Concluyendo que el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) a las concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml, sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* obteniéndose a la concentración de 50 mg/ml un promedio de halos de 25,5 mm y 32,7mm lo que indica mayor inhibición de ambas bacterias a esta concentración.

Dalirsani Z¹⁴, et al. (Iran, 2011) “Comparación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos de hierbas y luego contra *Streptococcus mutans* con clorhexidina” y tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano in vitro de diez extractos de plantas entre ellas *R. officinalis* (Romero) sobre *S. mutans* y clorhexidina al 0,12% que fue usado como control positivo. Para lo cual se utilizó 30 gr para cada planta y se disolvieron en 100 ml de metanol puro. Para determinar el efecto antibacteriano, se sembró las bacterias en placas con agar sangre usando el método de Kirby-Bauer (discos). Tras 24 horas se midió el halo de inhibición para comprobar su acción. Trascendió que el extracto de *R. officinalis* (romero) produce un halo promedio de 11.5 mm y para clorhexidina el cual produce un halo promedio de 14,6 mm. Se concluye que *Rosmarinus officinalis* tiene actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*.

2.2.Marco teórico

2.2.1. Caries dental:

Enfermedad infecciosa, progresiva, transmisible, multifactorial, localizada sobre las superficies del diente, esto ocurre por la acción de ácidos generados por bacterias que producen la desmineralización y destrucción de los tejidos duros.^{15,16}

2.2.1.1. Etiología de la caries:

La etiología de la caries depende de factores ya conocidos: el huésped (higiene bucal, la saliva y los dientes), la microflora (infecciones bacterianas) y el sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, deberá tenerse en cuenta uno más, el tiempo. Para que se forme una caries es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables; es decir, un huésped susceptible, una flora oral cariogénica y un sustrato apropiado que deberá estar presente durante un período determinado de tiempo.^{17,18}

A continuación, desarrollaremos cada uno de ellos:

a) Huesped:

Saliva:

Secreción líquida de la cavidad bucal producidas por las glándulas sublingual, parótida y submaxilar, incoloro de consistencia acuosa. Está compuesta por agua que en su totalidad es del 95%, la cual se disuelve y el 5% formado por sales. Tiene la capacidad de mantener el pH de 6.5 a 7.5 de la cavidad oral, dar protección al esmalte y es reparadora. Además, la secreción salival juega un papel importante en la homeostasis, los mecanismos fisiológicos y la composición molecular de la saliva, contribuyendo al mecanismo de defensa para la salud buco dental. La cantidad adecuada de flujo

salival favorece la eliminación de sustratos bacterianos y protege las superficies bucales.¹⁹

Diente:

Órgano anatómico compuesto por calcio y fósforo lo que le otorga dureza. Presentan tres particularidades: Proclividad, Permeabilidad adamantina y Anatomía, las cuales favorecen al desarrollo de las caries.¹⁹

b) Microflora:

La microflora de la cavidad bucal está compuesta por una gran diversidad de poblaciones microbianas como bacterias Gram+ (*Streptococcus spp*), Gram-, hongos, espiroquetas, micoplasmas y protozoos.²⁰

c) Dieta cariogénica:

Los desencadenantes para el desarrollo de la caries son los alimentos ricos en alta cantidad de azúcar y carbohidratos complejos (almidón).²¹

2.2.2. Biopelícula oral:

Son ecosistemas microbianos organizados, por diferentes microorganismos dentro de las cuales se presentan en comunidades o grupos bacterianos, adjuntos a una superficie viva y dura. Esta se caracteriza por la excreción de una matriz intercelular adhesiva protectora.²²

Dichos microorganismos dentro de esta estructura se comunican entre sí, dando paso a la regulación y manifestación de sus genes a través de unas moléculas de señalización. Su composición es variable de acuerdo a su localización y tiempo.²³

Se divide en:

a) Formación de la película dental:

Al inicio cuando se forma la biopelícula todas las superficies de la cavidad bucal se encuentran embebidas de esta delgada capa orgánica derivada de la saliva.

Está compuesta de glucoproteínas, proteínas ricas en prolina e histidina, fosfoproteínas, enzimas y otras moléculas que funcionan como como sitios específicos de adhesión para las bacterias. Se ha probado que las bacterias pueden volverse parte del depósito inicial pocos segundos después de una limpieza dental.²³

b) Colonización inicial o colonización primaria

La adquisición del microbioma humano se produce ya en el momento del nacimiento, siendo un proceso que continua con el paso del tiempo hasta su conformación final en pocos años. En la boca los primeros colonizadores son estreptococcus de los *grupos mitis y salivarius*; a los pocos días o semanas de edad también se pueden detectar enterobacterias, estafilococos, hongos levaduriformes (microorganismos que, en general, acaban desapareciendo) y otras bacterias de los géneros *Actinomyces* (*A. viscosus*), *Fusobacterium*, *Eikenella*, *Haemophilus* y *veillonella*. Esta microbiota que proviene de los padres y familiares más cercanos, se establece definitivamente, incluso con la llegada de especies como *Streptococcus sanguis*, *S. mutans* y bacterias gramnegativas anaerobias estrictas, hecho que coincide con la erupción de los dientes.²²

c) Colonización secundaria y maduración

Después de la multiplicación activa de los microorganismos colonizadores primarios, a estos se incorporan otras especies microbianas dando lugar a la llamada colonización secundaria. A medida que la placa aumenta, las zonas más profundas de la misma evidencian un déficit de oxígeno, por lo que las bacterias aerobias van desapareciendo de dicha zona y se añaden otras con un potencial de oxidorreducción más bajo.²³

Habiendo una serie de microorganismos secundarios (Gram-) que se adhieren a las bacterias de la placa, siendo estos los siguientes: *P. loescheii*, *P. intermedia*, *Capnocytophaga sp*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*, de los cuales, ya que estos no colonizan al principio superficies dentales limpias, sino que se adhieren a bacterias que ya se encuentran en la masa de la placa por congregación. Dichos colonizadores secundarios caen dentro de dichos complejos llamados: complejo verde incluye (*Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo a y especies de *Capnocytophaga*); complejo naranja incluye especies de (*Campylobacter*, *Fusobacterium* y *Prevotella*) y el complejo rojo (está integrado por *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *treponema denticola*). La existencia de dichos complejos de especies en placa es otro reflejo de la interdependencia bacteriana en el ambiente de acuerdo a cada grupo de la biopelícula.²²

2.2.2.1. Composición y arquitectura

Se compone fundamental de: agua, microorganismos. La matriz extracelular de sustancias poliméricas (EPS), supone entre un 75% y un 95% del volumen del biofilm. Esta matriz extracelular se compone de polisacáridos, proteínas, lípidos, minerales y ADN de origen microbiano.²⁴

La arquitectura de la matriz no es sólida, presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Estas circunstancias aumentan la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm.^{25,26}

2.2.2.2.Etapas en el ciclo vital:

El ciclo vital: proceso dinámico que puede dividirse en tres momentos:

Adhesión: de los microorganismos ocurrirá más fácilmente en aquellas superficies más ásperas, en hidrofóbicas no polarizadas y las recubiertas por biopelículas condicionantes.²⁷

Crecimiento: en la que se inicia el proceso de reproducción, el aumento considerable de especies que llevan a la formación de microcolonias y a la expresión de genes regulados por QS para la elaboración de la matriz de exopolisacáridos, que también contiene proteínas, minerales y ADN que recubren a las microcolonias.²⁷

Separación o desprendimiento: establece nuevas microcolonias y el desarrollo de otras comunidades nuevas que garanticen la colonización de toda la superficie.²⁷

2.2.3. Streptococcus mutans

Los estreptococos del grupo *mutans*, son importantes agentes etiológicos asociados con las etapas iniciales en caries dental y entre estos *S. mutans* de serotipo c y e. los serotipos de *Streptococcus mutans* van desde serotipo a hasta h, siendo estos microorganismos más relacionados con esta patología. Teniendo en cuenta que la caries dental es una entidad ocasionada por un agente infeccioso específico. El *Streptococcus mutans* es un patógeno dental causante de bacteriemias y endocarditis infecciosa, determinándose su alta frecuencia en enfermedades cardiovasculares.²⁸

2.2.3.1. Definición

Es una bacteria Gram +, no móvil, esférica, anaerobia facultativa que crece en cadenas o pares y se divide a lo largo de un eje. *S. mutans* crece rápidamente a 37° C, y algunas cepas pueden crecer a 45° C.^{29,30}

2.2.3.2. Hábitat

Se encuentra en la cavidad oral humana formando parte de la biopelícula. Es la primera que causa de caries dental después de la erupción dental.³¹

2.2.3.3. Medio de cultivo *Streptococcus mutans*

El medio de cultivo más utilizado es Infusión Cerebro Corazón (BHI), además se utiliza Mitis salivarius Agar (MSA), (TYS20B) y Agar Todd Hewitt (TH) (medio selectivo para *Streptococcus*).^{32,33,34}

2.2.3.4. Poder patógeno

La relación entre la bacteria *Streptococcus mutans* y caries tiene características las cuales son las siguientes: Incremento de seres vivos con caries activa; capacidad de

establecer una conclusión general a partir de estudios en animales de laboratorio y protección de estos mismos cuando estén inmunizados.³⁵

2.2.3.5. Factores de virulencia

Entre ellas tenemos: Poder Acidógeno: porque fermenta el azúcar para producir ácido láctico; Poder Acidúrico: sintetiza el ácido en Ph bajo; Poder Acidófilo: El *S. mutans* vive en Ph bajo; Síntesis de glucanos y fructanos: a partir de sacarosa para adherirse al diente; Síntesis de polisacáridos intracelulares: como el glucano, produce ácidos sin consumir azúcar y Producción de dextrosa: moviliza reservas de energía, esta enzima regula la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.³⁶

2.2.3.6. American Type Culture Collection (ATCC)

Es necesario un período de recuperación (incubación) en el caldo para lograr un crecimiento confluyente en las placas, y es mejor de los tubos de caldo secundarios. Cuando cultivamos ATCC® 25175™, rehidratamos todo el sedimento con aproximadamente 0.5 ml de caldo BHI. Luego transferimos asépticamente todo el contenido a un tubo que contiene de 5 a 6 ml de caldo BHI. Se deben inocular tubos de ensayo adicionales transfiriendo 0,5 ml del tubo de caldo primario mezclado a fondo a estos tubos secundarios. Los tubos de caldo se incuban a 37°C, se controlan a las 24 horas y se incuban hasta 48 horas para obtener el mejor crecimiento. El segundo día después de la iniciación, se observa una gran turbidez en los tubos de caldo primario y secundario. Usamos varias gotas del tubo de caldo para inocular una placa BHI y / o agar BHI inclinado. Esto generalmente se hace con una pipeta estéril y luego se separa con un asa de inoculación para asegurarse de que se transfiera suficiente inóculo.³⁷

2.2.4. Clorhexidina

Es una biguanida catiónico con pronunciadas propiedades antisépticas y es una sustancia desinfectante de acción bactericida y fungicida.³⁸

Es ampliamente utilizado en diferentes concentraciones en la irrigación de zonas afectadas por sepsis odontogénica, en tratamientos periodontales, así como reduce la placa bacteriana y gingivitis.^{39,40}

2.2.4.1. Actividad Antimicrobiana:

Es bacteriostático a bajas concentraciones y bactericida a concentraciones altas. La actividad antimicrobiana es atribuida a su unión y disrupción de la membrana citoplásmica, que alteran el equilibrio osmótico y causan precipitación de los contenidos celulares. Es activa contra bacterias Gram+, Gram-, y levaduras y hongos. La clorhexidina es de rápida absorción en superficies dentales tanto limpias como película adquirida, manteniéndose en boca a ciertas concentraciones y se va liberando entre 8 a 12 horas después, su ph oscila entre 5,5 a 7.0 que lo mantiene activo contra microorganismos Gram+ y Gram-.⁴¹

Sustantividad: La CHX adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas de forma activa. Tras 24 horas, aún pueden recuperarse concentraciones bajas de CHX, lo que evita la colonización de bacterias durante ese tiempo. Su alta sustentividad es debida a que se adsorbe rápidamente por la superficie bacteriana, gracias a su pH neutro y ligeramente alcalino. Se une a las bacterias de la placa, al esmalte dental, a la película adquirida que cubre el diente y lentamente va liberándose, produciendo efectos negativos en el citoplasma bacteriano e imposibilitando la supervivencia de los patógenos.⁴¹

La molécula de CHX se fija en la mucosa, mediante la unión a los grupos carboxilos presentes en la capa de mucina que rodea la mucosa. Posteriormente, y debido a la segregación de iones calcio por las glándulas salivares, las moléculas de CHX son liberadas lentamente.⁴¹

2.2.4.2. Acción Farmacológica:

La clorhexidina es de carga positiva, que le da la facilidad para ser absorbida por las superficies negativas como son la mucosa, dientes, biofilm (aniones y cationes). A lo largo de las 24 horas de aplicación, su principio activo es liberado lentamente, bajo un efecto bacteriostático continuo. Esta indicado en pacientes que padecen de gingivitis aguda, leve, estomatitis aftosa y post tratamiento de profilaxis.⁴²

Se puede encontrar en concentraciones de:

- a. Clorhexidina al 0,12%:** realizar enjuagues de 15ml, ya que en esta concentración se libera en boca 18mg.
Antiséptico bucal de amplio espectro frente a las bacterias patógenas orales y de larga duración (elevada sustentividad).
- b. Clorhexidina al 0,2%:** realizar enjuagues de 10ml, ya que en esta concentración se libera en boca 20mg.
- c. Cloruro de Cetilpiridinoal 0,05%:** antiséptico con elevada actividad anti-placa que potencia la acción de la clorhexidina.

2.2.5. Rosmarinus officinalis (Romero)

2.2.5.1. Definición

El romero, arbusto de tallos prismático, leñoso y aromático, muy denso y ramoso, de 0,5mm hasta 2mm, el cual posee ramas erguidas de color verde intenso que miden de 1.2mm a 3.5mm, en forma de pedúnculos estrellados, que crece sobre todo tipo de suelos, aunque prefiere los calcáreos, en sitios secos y soleados, principalmente laderas pedregosas y márgenes de caminos.^{43,44}

2.2.5.2. Clasificación taxonómica

R. officinalis taxonómicamente pertenece a la familia (Lamiaceae) género *Rosmarinus* y especie *Rosmarinus officinalis* L.⁴⁴

2.2.5.3. Composición química y principios activos

En su composición se encuentran flavonoides, polifenoles, triterpénicos, aceite esencial, ácidos fenólicos. También están presentes principios amargos como diterpenos, terpenoides y taninos.^{45,46,47}

2.2.5.4. Actividad antibacteriana

Las hojas de romero en extractos muestran una efectividad antimicrobiana más fuerte en el rango de 0.02 a 0.06 mg / mL para grampositivos y a 1.03 mg / ml para bacterias gramnegativas, lo que podría explicarse por la presencia de carnosic ácido como el principal compuesto antimicrobiano bioactivo en extractos de romero.⁴⁸

2.2.5.5. Propiedades Medicinales de *R. officinalis*

Al romero se le atribuyen diversas propiedades medicinales, como: hiperglucemiante, antiséptico, antifúngico, estimulante del SNC, antiinflamatorio, antibacteriano y otros.^{49,50}

2.2.6. Foeniculum vulgare (Hinojo)

2.2.6.1. concepto

Es una planta medicinal que pertenece a la familia de las Umbelíferas, también denominadas Apiáceas. Se cultiva en casi todos los países.⁵¹

2.2.6.2. Botánica

Crece hasta más de 3 m de altura, hojas ovadas o deltoideas, de unos 30 × 40 cm, con lóbulos acuminados.⁵²

2.2.6.3. Composición Química

Las hojas de *Foeniculum vulgare* están compuestas por Proteínas, Lípidos totales, Carbohidratos, Fibra dietética tota, Azúcar, Minerales y Vitaminas.^{53,54}

2.2.6.4. Actividades Farmacológicas:

Se le atribuye actividad antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, antidiabético, hepatoprotector, estrogénico, antitrombótico, antioxidante.⁵⁵

2.2.6.5. Actividad antibacteriana:

El hinojo se usa para tratar muchas bacterias, hongos, virus, y enfermedades infecciosas micobacterianas. Hinojo tiene actividad antibacteriana debido a compuestos tales como, ácido linoleico, undecanal, 1, 3-bencenodiol, ácido oleico y

2,4-undecadienal. El hinojo tiene 5-hidroxi-furanocumarina que tiene un papel importante en la actividad antibacteriana de esta planta. El cual se ha demostrado que el extracto de *Foeniculum vulgare* inhibe el aumento de ciertos microorganismos, especialmente el de *Streptococcus mutans*, quien es responsable de la iniciación de la caries oral y diversas enfermedades periodontales; y en aceite esencial *Foeniculum vulgare* goza también de propiedades antibacterianas y antifungicas.⁵⁶

2.2.6.6. Efecto Antitumoral:

Las gramíneas del Hinojo han exteriorizado un cierto impacto preventivo y suspensorio sobre un patrón experimental de quiste gástrico. La tisana de hinojo ha presentado un ámbito citoprotector frente a la actividad carcinogénica del ácido tricloroacético.⁵⁶

2.2.6.7.Efecto Antiinflamatorio:

La administración de 200mg/kg de peso del extracto metanólico de legumbres de hinojo inhibe la inflamación aguda y subaguda en prototipos experimentales de tumefacción.⁵⁶

2.2.6.8. Efecto hepatoprotector:

El hinojo puede exhortar en el animal de experimentación la hepatotoxicidad inducida por el tetracloruro de carbonilo.⁵⁶

III. Hipótesis

El extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* tiene mayor efecto antibacteriano que el extracto hidroetanólico de *Foeniculum vulgare* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

IV. Metodología

4.1 Diseño de investigación:

Tipo: Cuantitativa

Nivel: Explicativo

El presente trabajo de investigación presenta un diseño:

Experimental: puesto que el investigador a manipulado variables, que se estiman independientes.⁵⁷ El estudio manipuló las concentraciones de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*.

Prospectivo: son aquellos en los cuales la información se va registrando en la medida que va ocurriendo el fenómeno o los hechos programados para observar.⁵⁷ Porque en el estudio se midió la variable dependiente cuando se inició el estudio.

Transversal: Porque se realizó observaciones en un momento único en el tiempo dentro del estudio.⁵⁷ Él estudió midió el efecto antibacteriano a las 24 horas.

Analítico: Explica y contestan el por qué o la causa de presentación de determinado fenómeno o los hechos programados para observar.⁵⁷ En el estudio se manipuló los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*.

4.2 Población y Muestra:

a) Población:

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

b) Criterios de Selección:

Criterios de inclusión:

- Placas Petri sembradas con Cepas de *Streptococcus mutans*.

Criterios de exclusión:

- Placas Petri con halos de inhibición no muy claros.
- Placas Petri con signos de contaminación.

c) Muestra:

Tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño de la muestra, por ser experimental se empleó la siguiente formula

$$n = 2 \left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (DE)^2 / d^2$$

Dónde:

n: tamaño de muestra para el grupo de estudio.

α : probabilidad de cometer error tipo I.

β : probabilidad de cometer error tipo II.

Z: valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: desviación estándar.

d: diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 95% ($\alpha=0.05$, $Z=1.96$), y una potencia en la prueba del 80% ($\beta=0.20$, $Z=0.84$), para ($DE/d=0.80$).

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2(0.8)^2$$

$$n = 10$$

4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Indicador	Valor final	Tipo	Escala de medición
<p>Variable independiente</p> <p>Extracto Hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> y Extracto hidroetanólico de <i>Foeniculum vulgare</i></p>	<p>Es una especie de planta leñosa perenne, originaria de la región mediterránea, sus hojas se usan comúnmente como condimento y también sirven para fines medicinales.⁵⁸</p> <p>Además, la siguiente es una hierba periódica con potente importancia medicinal, es utilizado para los problemas digestivos, respiratorios, y dentro de sus propiedades tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.⁵⁹</p>	<p>Sustancia antibacteriana en base a <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Foeniculum vulgare</i> a diferentes concentraciones.</p>	<p>Concentración</p>	<p>Extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Foeniculum vulgare</i> al 50%.</p> <p>Extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Foeniculum vulgare</i> al 75%</p>	<p>Cualitativo</p>	<p>Ordinal</p>
<p>Variable dependiente</p> <p>Efecto Antibacteriano sobre el <i>Streptococcus mutans</i></p>	<p>Que sirve para combatir las infecciones causadas por bacterias.</p>	<p>Inhibición en el desarrollo o crecimiento de las bacterias debido a la presencia del extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Foeniculum vulgare</i></p>	<p>Halos de inhibición/ diámetros</p>	<p>mm</p>	<p>Cuantitativo</p>	<p>De Razón</p>

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

4.4.1. Técnica: observación microbiológica

4.4.2. Instrumento:

Para medir el efecto antibacteriano se utilizó un Vernier Digital Marca Mitutoyo - Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad 17025. (Anexo 1)

Ficha de Recolección de datos. (Anexo 2)

4.4.3. Procedimientos:

Obtención de los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*

Recolección

Se recolectó 2 Kg de *Rosmarinus officinalis* y 2 Kg de *Foeniculum vulgare*, por la mañana, del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo, del distrito de Trujillo (34 m.s.n.m.), provincia de Trujillo y de la región La Libertad, durante el mes de enero del año 2018.

Identificación Taxonómica

Luego un ejemplar completo de cada planta fue llevado al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación y posterior verificación taxonómica. (Anexo 3)

Preparación de la muestra vegetal

Selección: Las hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* fue recolectado y transportado al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se seleccionó las hojas que estén en buenas condiciones, que no estén decolorados y marchitas. (Anexo 4)

Lavado y desinfección: Luego se lavó las hojas con agua destilada, y se desinfecto con hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se realizó un enjuague de cada planta con suficiente agua destilada estéril, para retirar los residuos de hipoclorito.⁶⁰

Secado: Las hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* fueron colocadas sobre papel Kraft y sometidas a secado primero a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se llevó a secar a la estufa de circulación de aire por convección forzada a una temperatura de 40°C. Se realizó la determinación de peso cada 24 horas hasta valores constantes.⁶⁰

Pulverización: Las hojas una vez secadas de ambas especies, fueron pulverizadas con ayuda de un molino y mortero.⁶⁰

Tamizaje: Luego las hojas pulverizadas, fueron tamizadas a través del tamiz N° 075.⁶⁰

Almacenamiento: Los polvos de las hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* obtenidos, fueron guardados por separado en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha.⁶⁰

Preparación de los extractos hidroetanólicos de las hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*.

Se pesó con exactitud por separado 250 g de polvo de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*, previamente tamizados. Luego se colocó en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha, de capacidad de 1 litro y se añadió etanol al 70° G.L. cantidad suficiente hasta cubrir la muestra por sobre 2 cm de altura.⁶⁰

Se mezclaron bien, teniendo en cuenta que la mezcla debe ocupar como máximo las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente. Se tapó los recipientes y se maceró por 7 días, agitándose 15 minutos, dos veces al día.⁶⁰

Transcurrido el tiempo de maceración, se filtró los macerados, al vacío con papel de filtro Whatman N° 1. Las soluciones resultantes fueron llevadas a sequedad en una cámara de secado al vacío a una presión reducida y a una temperatura de 40 °C; luego se pesó los residuos secos y se guardó en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio de color ámbar estéril. A partir de los extractos secos, se preparó las concentraciones de 50% y 75% disueltas en etanol de 70° G.L. respectivamente. Finalmente, los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* fueron guardados en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su posterior utilización.⁶⁰

Preparación de las concentraciones del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo).

A partir de los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) se prepararon las concentraciones de 50% y 75% respectivamente.⁶¹

Preparación de la mezcla de los extractos hidroetanólicos de las hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*.

Las concentraciones de los extractos hidroetanólicos preparadas al 50% de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*, se mezcló en porciones de 1:1; mismas proporciones se usaron para la preparación de la mezcla de las concentraciones del 75% de ambos extractos.⁶¹

Reactivación frente a *S. mutans* ATCC 25175.

Para este estudio se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Brain Heart Infusión (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, luego se incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia.⁶¹

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar TSYB e incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración gram.⁶¹

A partir de una colonia se sembró en caldo BHI y en Agar Trypticosa Soya (TSA), y se conservó hasta su posterior empleo.⁶¹

Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175.

La cepa *S. mutans* ATCC 25175 mantenida en Caldo BHI se sembró en Agar TSA, se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Luego de 24 horas de 3 a 4 colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se diluyó en caldo BHI o solución salina fisiológica estéril hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 ufc/mL).⁶³

Inoculación de las placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 ufc/ml), se tomaron una alícuota de 100µl y se colocaron en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión, se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme

del inóculo en la placa. Se dejó secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbida.⁶³

Enfrentamiento Microbiológico

Evaluación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer.¹⁷

La evaluación del efecto antibacteriano, se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar⁶¹

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Preparación de los discos con los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*.

Se preparó discos de papel filtro whatman número 3 y se esterilizaron, luego se embebió con 50 ul de cada una de las concentraciones de 50%, 75% de extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*. Respectivamente, y la mezcla de cada concentración. Se utilizó una pinza estéril, y se procedio a la colocación de los discos en las diferentes placas de Müller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.⁶²

Se empleó como control positivo a clorhexidina al 0.12% y teniendo como control negativo a etanol al 70%.

Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, a 37°C durante 24 y 48 horas en microanaerobiosis utilizando jarra Gaspak y con el método de la vela. (Anexo 9)

Lectura de los resultados

Después del tiempo de incubación de 48 horas se examinó cada placa, y se midió los diámetros en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco. Para lo cual se utilizó una regla milimetrada vernier digital, abarcando el diámetro del halo⁶³.

Se realizó 10 repeticiones de cada ensayo (disco)

Para la interpretación de los resultados, se tomó como referencia la escala de Duraffourd que es utilizada para evaluar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro según el diámetro de inhibición:

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

4.5. Plan de análisis

Los datos experimentales fueron ingresados en bases de datos en IBM SPSS Statistics versión 23 trabajándose con la prueba estadística ANOVA. Luego se realizó una prueba de comparación múltiples utilizando la prueba de Duncan. Ambas pruebas con un nivel de significancia al 5%. Los datos fueron organizados y presentados en Tablas y Gráficos estadísticos para su análisis e interpretación.

4.6 Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Población	Metodología
¿Cuál es la diferencia, <i>in vitro</i> , del efecto antibacteriano, entre los extractos hidroetanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Foeniculum vulgare</i> frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	<p>Objetivo General</p> <p>1.Comparar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano entre el extracto hidroetánolico de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Foeniculum vulgare</i> frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>2.Evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroetánolico de <i>R. officinalis</i> al 50% y 75% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>3.Evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroetánolico de <i>F. vulgare</i> al 50% y 75% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>4.Evaluar el efecto sinérgico de la mezcla de los extractos hidroetánolico de <i>R. officinalis</i> y <i>F. vulgare</i> frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>5.Comparar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano entre las concentraciones del extracto hidroetanolico de <i>R. officinalis</i>; <i>Foeniculum vulgare</i> y Digluconato de clorhexidina al 0,12% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>6.Comparar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano entre las concentraciones del extracto hidroetanolico de <i>R. officinalis</i>; <i>F. vulgare</i> y Etanol al 70% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175.</p>	El extracto hidroetanolico de <i>Rosmarinus officinalis</i> tiene mayor efecto antibacteriano que el extracto hidroetanolico de <i>Foeniculum vulgare</i> frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<p>Efecto antibacteriano</p> <p>Extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus Officinalis</i>.</p> <p>Extracto hidroetanolico de <i>Foeniculum Vulgare</i>.</p>	La población estuvo conformada por el conjunto de placas Petri sembrada con 100 µL de suspensión bacteriana de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	<p>Tipo de investigación:</p> <p>Cuantitativa.</p> <p>Diseño de investigación:</p> <p>Experimental, Prospectivo, Transversal, Analítico</p>

4.6 Principios éticos:

Este estudio de investigación se fundamentó en el código de ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, además al finalizar el estudio las placas Petri fueron expuestas a 121° C y 1 Bar de presión en autoclave. A fin de desechar el material biológico contaminado.

Se adquirió un documento en el cual acredita la eliminación de material biológico contaminado llamado “MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA MANEJO Y ELIMINACIÓN DE RESIDUOS BIOLÓGICOS” de la Facultad de Ciencias Biológicas”.⁶⁴

En esta categoría se incluye a:

Cultivos y muestras almacenadas: residuos de la producción de material biológico, placas de cultivo y mecanismos para transferir, inocular o mezclar cultivos; residuos de cultivos, incluyendo cultivos de laboratorios médicos y patológicos; y cultivos y cepas de agentes infecciosos de laboratorios.⁶⁴

Los residuos microbiológicos y patológicos deben ser eliminados de forma tal que se asegure su descontaminación en autoclave (residuos microbiológicos) o incineración (residuos patológicos). Esto significa una bolsa primaria de color negro, llena solo hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad y anudada y sobre ésta una bolsa color amarillo con logo y pre impreso de residuos especiales, deberán marcar el tipo de residuos que contendrá, el laboratorio o área de generación y la fecha. Estas bolsas cerradas anudadas, deberán almacenarse temporalmente en las áreas sucias en contenedores de color amarillo con logo de Residuo Biológico.⁶⁴

V. Resultados

5.1 Resultados

Tabla 1. Comparación, *in vitro*, del efecto antibacteriano, entre los extractos hidroetánicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Concentración	N	Halo X	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		p*	
				Límite inferior	Límite superior		
Rosmarinus officinalis (Romero)	50%	10	23.78	1.24	22.89	24.67	0.000
	75%	10	27.88	0.74	27.35	28.41	
Foeniculum vulgare (Hinojo)	50%	10	19.83	3.64	17.22	22.44	
	75%	10	23.14	0.25	22.96	23.32	
Romero + Hinojo	50%	10	26.76	1.25	25.86	27.66	
	75%	10	30.21	0.82	29.62	30.80	
Clorhexidina 0.12%	10	25.85	0.55	25.46	26.24		
Etol 70%	10	9.10	0.32	8.87	9.33		

p*: prueba ANOVA

Nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

Interpretación:

Se comparó el efecto antibacteriano entre los extractos hidroetánicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) (50% y 75%), *Foeniculum vulgare* (hinojo) (50% y 75%) y *Rosmarinus officinalis* + *Foeniculum vulgare* (romero + hinojo) (50% y 75%) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175; en *Rosmarinus officinalis* (romero) al 50% se obtuvo una media 23.78mm y al 75% se obtuvo una media 27.88mm; en *Foeniculum vulgare* (hinojo) al 50% se obtuvo una media 19.83mm y al 75% se obtuvo una media 23.14mm, (Romero + hinojo) al 50% se obtuvo una media 26.76mm y al 75% se obtuvo una media 30.21mm, Se utilizó la prueba ANOVA y se obtuvo $p=0.000$, lo que indica que existe diferencia estadística significativa entre los tipos de concentración.

Tabla 2. Subgrupos del efecto antibacteriano, entre los extractos hidroetánicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175

Grupos	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Etanol 70%	10	9,1000					
H 50%	10		19,8300				
H 75%	10			23,1400			
R 50%	10			23,7800			
Clorhexidina 0,12%	10				25,8500		
R-H 50%	10				26,7600	26,7600	
R 75%	10					27,8800	
R-H 75%	10						30,2100
DUNCAN Sig.		1,000	1,000	0,344	0,180	0,100	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

H= Hinojo R= Romero R – H: Romero + Hinojo

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

Interpretación:

No se encontraron diferencia estadística entre el efecto de: Romero más Hinojo al 50% y Romero al 75%; Digluconato de clorhexidina al 0,12% y Romero más Hinojo al 50%; Hinojo al 75% y Romero al 50%. Todos los demás extractos presentaron diferente efecto.

5.2 Análisis de resultados

En la presente investigación de tipo experimental, *in vitro*, se comparó la efectividad antibacteriana, del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Foeniculum vulgare* (Hinojo), a concentraciones del 50% y 75% frente a cepas de *Streptococcus mutans*. Los resultados demostraron que el *Streptococcus. mutans* es susceptible a la acción del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* a medida que aumenta la concentración se obtiene mayores halos de inhibición. Así mismo la acción antibacteriana del extracto sinérgico al 75% fue significativamente mayor que la de Digluconato de clorhexidina 0,12% y etanol al 70%. Esto se debería a la presencia dentro de las hojas del *Rosmarinus officinalis* presentan en su composición los polifenoles los cuales desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, donde pueden retrasar el crecimiento bacteriano debido a que cambian las condiciones del medio y penetran en la membrana celular de los microorganismos provocando lisis.¹¹ Se ha reportado que algunos ácidos orgánicos presentes como (ácido ascórbico, ácido rosmerico, ácido cafeico) son compuestos que inhiben el crecimiento de algunas bacterias. Algunos flavonoides tienen su participación en la inhibición debido a que estos generalmente se relacionan con la inhibición de síntesis de ADN y ARN bacteriana y otras macromoléculas.⁵⁰

Estos resultados se asemejan con los hallados por **Sosa J¹². (2015)** quien encontró valores de halos de inhibición similares proporcionales en la concentración al 50%, la similitud de los resultados se debe a que se aplicó el mismo método, misma técnica de elaboración para la obtención del extracto y enfrentamiento microbiológico, por ende, esto nos da una idea de que las hojas recolectadas en nuestro medio (altitud, clima,

tierra) son lo suficientemente buenas para proporcionar y mantener la composición química de las hojas al cual se le atribuye su actividad antimicrobiana.

Asimismo, nuestros resultados difieren con **Darlisani, et al¹³. (2011)** quien obtuvo a bajas concentraciones, halos menores al investigado, este se debería a que se quiso investigar si a dicha concentración producía efecto antibacteriano, verificándose si su promedio de halo era proporcional a su concentración, siendo menores al obtenido.

Nuestros resultados también difieren con: **Cueva J⁸, (2017)**. Quien obtuvo halos de inhibición menores al estudiado, esto se debería ya que por tratarse de aceites esenciales es más liviano y por ello se dejó mayor tiempo de incubación. Observándose que si hubo efectividad antibacteriana. **Solano X⁹, et al (2016)** utilizó la extracción de su extracto oleoso al vapor a una concentración del 50% el cual produjo un promedio menor al nuestro. **Rocha R¹¹, (2016)** presentó halos de inhibición, y los tamaños de estos aumentaron directamente proporcional a dichas concentraciones siendo menores al estudiado. Estos tres autores utilizaron la extracción de sus aceites esenciales, en contacto con el calor lo cual hizo que los porcentajes de cada compuesto químico disminuya. Ya que al aplicar este método rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, lo que ocasiona que el aceite sea más liviano. Esto nos conlleva que el aceite esencial posee bajas propiedades químicas el cual se verifica con dichos resultados teniendo halos menores, por lo tanto, en los extractos de plantas se concentran mejor sus compuestos químicos. Por ende, esto se deba a factores intrínsecos y externos tales como la variedad del vegetal, el tipo de suelo, el ph, la temperatura ambiental, su cultivo, cosecha y el método de extracción, los cuales

pueden afectar la composición química teniendo en cuenta las condiciones de la tierra y climas quienes son importantes¹¹.

Otro hecho importante con respecto al extracto hidroetanólico de *Foeniculum vulgare* a concentraciones de 50% y 75% frente a cepas de *Streptococcus mutans*. Cuyos resultados obtenidos demostraron que el *S. mutans* es susceptible a la acción del extracto hidroetanólico de *Foeniculum vulgare* a medida que aumenta la concentración se obtiene mayores halos de inhibición. Los resultados difieren con el obtenido por **Baca L, Yábar A¹⁰, (2016)** quien para la elaboración de su estudio utilizó aceite esencial de *Foeniculum vulgare* frente a *streptococcus mutans* a una concentración del 100% mayor, obteniendo halos de un promedio menor, siendo no proporcional al obtenido. Esto se debería al método que utilizó llamado “arrastre a vapor”, el cual para extraer su aceite esencial entra en contacto con el calor, lo que hace que su compuesto químico se altere disminuyendo su composición. Su actividad antimicrobiana se le atribuye a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas partes de la célula microbiana. Esto también se debería a que al momento de cosecharse la planta presentó en sus hojas signos de contaminación, tipo de suelo, clima, etc. En nuestro estudio se utilizó extracto el cual hace que se preserve las concentraciones y la estabilidad del material en cuanto a su composición química.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de los extractos hidroetanólicos siendo que, a mayor concentración, tiene mayor efecto antibacteriano, destacando el extracto de *Rosmarinus officinalis* al 75%; el extracto sinérgico de *Rosmarinus officinalis* + *Foeniculum vulgare* al 75% y *Foeniculum vulgare* al 75% ya que estos hallazgos dan la posibilidad de crear un fármaco, en el campo de la

investigación clínica como farmacología el cual se podría utilizar para contrarrestar o inhibir a las bacterias Gram positivas y Gram negativas dentro de las cuales está el *Streptococcus*. Constituyendo así una alternativa natural, eficiente y de bajo costo.

VI. Conclusiones

1. El extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* + *Foeniculum vulgare* al 75% presentó el mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*. Al 50% presentó el mismo efecto que *Rosmarinus officinalis* al 75%.
2. El extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* al 50% presentó el mismo efecto antibacteriano que el Digluconato de clorhexidina al 0,12%.
3. El extracto hidroetanólico de *Foeniculum vulgare* al 75% presentó mayor efecto antibacteriano que el *Rosmarinus officinalis* al 50%.
4. El extracto hidroetanólico de *Foeniculum vulgare* al 50% presentó el menor efecto antibacteriano.

Aspectos Complementarios

1. Valorar la efectividad antibacteriana del extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) frente a otros microorganismos de importancia de la cavidad bucal.
2. Se recomienda realizar estudios fitoquímicos del *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo), a fondo para reconocer correctamente su estructura química y principios activos, según donde fueron cultivadas, ya que pueden obtener un gran efecto antibacteriano.
3. Realizar estudios, *in vivo*, para la elaboración o formulación de enjuagatorios bucales, así como dentífricos que contengan extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) y la combinación de *Rosmarinus officinalis* (romero) más *Foeniculum vulgare* (hinojo) y otros estudios de más plantas medicinales para impulsar conocimiento de su acción sobre bacterias que causan la caries dental.

Referencias bibliográficas

1. Rodríguez H. Solar O. Uso indiscriminado de tetraciclinas en afecciones bucales de origen odontógenas. Rev. Cub. Estomatol. [Revista en línea] 2007 [Citado el 8 de setiembre del 2018]; 44:4(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475072007000100002
2. Aguirre P. Nivel de conocimiento sobre Profilaxis Antibiótica de Endocarditis Infecciosa previa a procedimientos odontológicos en internos de odontología de tres universidades de Lima – 2013 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
3. Zahabiyoun S, Sahabi M, Javad M. Improving Knowledge of General Dental Practitioners on Antibiotic Prescribing by Raising Awareness of the Faculty of General Dental Practice (UK) Guidelines. J Dent (Tehran). 2015; 12(3): 171-176.
4. Haliti R, Haliti R, Koçani K, Gashi A, Mrasori I, et al. Surveillance of antibiotic and analgesic use in the Oral Surgery Department of the University Dentistry Clinical Center of Kosovo. Ther Clin Risk Manag. 2015; 11(1): 1497–1503.
5. Palmer N, Dayley Y, Martin M. Can audit improve antibiotic prescribing in general dental practice?. Br Dent J. 2001; 191(1): 253–255.
6. Caviglia I, Techera A, García G. Antimicrobial therapies for odontogenic infections in children and adolescents. Literature review and clinical recommendations. J Oral Res. 2014; 3(1): 50-56.

7. González E. Active and transforming knowledge: some of their relationships with knowledge management. *Rev. Cub. Acimed.* 2011; 22(2): 110-120.
8. Cueva J. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *In vitro* [Tesis]. Perú: Universidad Privada Norbert Wiener. Facultad de odontología; 2017. Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1031/TITULO%20-%20Cueva%20Rosales%2c%20Javier.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
9. Solano S, Moya S, Zambrano G. Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. *Rev. Odontol.* [Revista en línea] 2016 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 19 (2): 29-34. Disponible en: [file:///C:/Users/Eder/Downloads/Dialnet-InhibicionDelStreptococcusMutansMedianteElUsoDeExt-5815882%20\(6\).pdf](file:///C:/Users/Eder/Downloads/Dialnet-InhibicionDelStreptococcusMutansMedianteElUsoDeExt-5815882%20(6).pdf)
10. Baca K, Yábar A. Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Cimnopogon citrus* (hierva luisa), *Origanum vulgare* (oregano), *Citrus aurantifolia swingle* (limon) y *Citrus sinensis* (naranja), frente a cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* [Tesis]. Perú: Universidad Andina del Cusco. Facultad de odontología; 2016. Disponible en: http://repositorio.uandina.edu.pe/bitstream/UAC/559/3/Lisseth_Adriana_Tesis_bachiller_2016.pdf
11. Rocha R. Evaluaron el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de odontología; 2016. Disponible en:

<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/7525/PROTEJIDO%20%20TESIS%20RAQUEL%20ROCHA%20MORALES.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

12. Castañeda P. “Efecto Antifúngico Del Extracto Etanólico De Las Semillas De *Foeniculum Vulgare* Mill. Sobre Cepa *Candida Albicans* Atcc 10804 In Vitro” [Tesis]. Perú: Universidad Privada Antenor Orrego. Facultad de Medicina Humana; 2016. Disponible en:

http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/2115/1/RE_MED.HUMA_JUAN.CASTA%3%91EDA_ANTIFUNGICO.DEL.EXTRACTO.ETANOLICO_DATOS.PDF

13. Sosa J. Efecto Antibacteriano *In vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* Y *Enterococcus faecalis* [Tesis]. Perú: Universidad Señor de Sipán. Facultad de Odontología; 2015. Disponible en:

<http://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/uss/129/1/tesis%20final%20josue%2025-11-2015.pdf>

14. 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* in chlorhexidine. Jour. Appl. Sciences. [Online] 2011 [Cited set 08; 2018]; 11 (5): 878-882. Available in: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/jas/2011/878-882.pdf>

15. Universidad Peruana Cayetano Heredia [homepage en Internet]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; [Consultado el 17 de noviembre del 2018]. Disponible en:

<https://sites.google.com/site/portafoliodeeduardoupchfaest/home/5-1-caries-dental-concepto-y-etilogia>

16. Miguelañez B, Pastor M, Sarría B. Estado actual de la etiología de la caries dental. Revisión bibliográfica del último año [Internet]. Univ. Rey. Ju. Carl. 2007 [Citado el 17 de noviembre del 2018]. Disponible en: http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2006-2007_G13.pdf
17. Cerón X. El sistema ICDAS como método complementario para el diagnóstico de caries dental. Rev. CES. Odontol. [Revista en línea] 2015 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 28(2): 100-109. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v28n2/v28n2a08.pdf>.
18. Núñez D, García L. Bioquímica de la caries dental. Rev. Haban. Cienc. Méd. [Revista en línea] 2010 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 9(2): 156-166. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n2/rhcm04210.pdf>
19. Barrios C. La saliva, flujo y Ph en relación a la actividad cariogénica. Rev. ODN. [Revista en línea] 2012 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 5(1): 1-6. Disponible en: <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/rfo/article/view/1715/1473>
20. Baños F, Aranda R. Placa dentobacteriana. Rev. ADM. [Revista en línea] 2003 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 60(1): 34-36. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2003/od031g.pdf>
21. Meneses I. Caries dental y su relación con el consumo de alimentos chatarras y bebidas endulzadas. Saludtlax. [Revista en línea] 2011 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 1(2). Disponible en: <http://www.saludtlax.gob.mx/documentos/revista/vol1/V01Art02.pdf>

22. Serrano J, Herrera D. La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla?. Rev. RCOE. [Revista en línea] 2005 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 1(4): 431-439. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/rcoe/v10n4/puesta3.pdf>
23. Sarduy L, Gonzáles M. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. Medicent. Electrónica. [Revista en línea] 2016 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 20(3): 167-175. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v20n3/mdc02316.pdf>
24. Ojeda JC, Oviedo E, Salas L. Streptococcus mutans y caries dental. CES Odontol. [Revista en línea] 2013 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 26(1): 44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005
25. Loera Muro A, Ramírez Castillo FY, Avelar González FJ, Guerrero Barrera AL. Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. Invest Cienc [internet]. 2012 ene.-abr. [citado el 17 de noviembre del 2018]; 54(1): 49-56. Disponible en: <http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista54/Articulo%207.pdf>
26. Echevarría García L. Técnicas y métodos de uso de las biopelículas en la búsqueda de procesos de biorremediación. Sci Int J [internet]. 2013 [citado 17 de noviembre del 2018]; 10(3): 32-43. Disponible en: <http://www.nperci.org/L.%20Echevarria-Biopeliculas-V10N3.pdf>

27. Roa N, Gómez S, Rodríguez A. Respuesta de células T, citocinas y anticuerpos frente al péptido (365-377) de la proteína de adhesión celular de *Streptococcus mutans*. Univ. Odontol. [Revista en línea] 2014 [Citado el 17 de noviembre del 2018]; 33(71): 29-40. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/2312/231242326005/>
28. Figueroa M, Guillermina A, Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. Acta odontol. venez. [Revista en línea] 2009 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 47 (1): 227-240. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000100026
29. Céspedes J. Leche y Estreptococos. KIRU. [Revista en línea] 2004 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 1(2), 1-11. Disponible en: http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2004_v1n2/2004v1n2art6.pdf
30. Chamorro A, Ospina A, Arango JC, Martínez M. Acción de la inmunoglobulina A secretora en el proceso de adherencia de *Streptococcus mutans* al diente humano. Rev. CES Odont. [Revista en línea] 2013 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 26(2) 76-106. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n2/v26n2a08.pdf>
31. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. Univ Odontol. [Revista en línea] 2014 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 33(71): 65-73. Disponible en:

<http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/14228>

32. Panreac Química S.A. Manual Básico de Microbiología. 4ta ed. Barcelona: Cultimed; 2003. Disponible en: http://www.comercialmedica.es/documentos/newsletter/n5_panreac_novedades6.pdf
33. Ojeda C, Oviedo E, Salas A. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev. CES Odont. [Revista en línea] 2013 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 26(1) 44-56. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
34. Medina R, Moreno L, Velasco M, Gutiérrez S. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “*In vitro*”. Rev. Nova. [Revista en línea] 2005 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 3(3): 25-30. Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/30/59>
35. Phillips W. La Ciencia De Los Materiales Dentales De Skinner. 9na ed. Editorial interamericana McGraw – Hill; 1993. Disponible en: <http://catalogosuba.sisbi.uba.ar/vufind/Record/201603170442295/Details>
36. Nuñez D, García L. Bioquímica de la Caries Dental. Rev. Hab. Cienc. Méd. [Revista en línea] 2010 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 9(2):156-166. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180414048004>
37. ATCC. *Streptococcus mutans* Clarke (ATCC 25175). 2017 [Citado el 08 de setiembre del 2018]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/25175.aspx#documentation>

- 38.** Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé M, Jemenao I, Medel M, et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Rev Chilena Infectol. [Revista en línea] 2017 [Citado el 08 de setiembre del 2018]; 34 (2): 156-174. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n2/art10.pdf>
- 39.** Torres M, Díaz M, Acosta A. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. Gac. Méd. Espirituana. [Revista en línea] 2009 [Citado el 30 de setiembre del 2018]; 11(1). Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.11.%281%29_08/p8.html
- 40.** Bascones A, Morante S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. Avances en Periodoncia. [Revista en línea] 2006 [Citado el 30 de setiembre del 2018]; 18 (1). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852006000100004
- 41.** Maya J, Ruiz S, Pacheco R, Valderrama S, Villegas M. Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. Asoc. Infect. 2011; 15(2): 98-107.
- 42.** Salazar A, Díaz S, García R, Díaz A, Acosta L. Efecto antimicrobiano de la clorhexidina en odontología. Rev. Odontol. Latinoam. [Revista en línea] 2016 [Citado el 30 de setiembre del 2018];8(2):31-35. Disponible en: <http://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V08N2p31.pdf>

- 43.** Ponce J, Guadalupe L, Arana C. Estudio Bromatológico de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y obtención del aceite esencial. Ciencia e Investigación. [Revista en línea] 2015 [Citado el 30 de setiembre del 2018]; 18(1): 9-13. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/13599/12008>
- 44.** Avila R, Navarro A, Vera O, Dávila R, Melgoza N, Meza R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios Ciencia y Mar. [Revista en línea] 2011 [Citado el 10 de noviembre del 2018]; 15(43): 23-26. Disponible en: <http://www.umar.mx/revistas/43/0430103.pdf>
- 45.** Coy C, Acosta G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (cúrcuma longa) de Colombia. Rev. Cub. Plant. Medicinales. [Revista en línea] 2013 [Citado el 10 de noviembre del 2018]; 18(2): 237-246. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n2/pla07213.pdf>
- 46.** López M. El romero: Planta aromática con efectos antioxidantes. OFFARM. 2008; 27(7): 60-63.
- 47.** Cruz J. Revista digital acerca de la Cultura Popular en las Islas Canarias. Revista BienMeSabe. [Revista en línea] 2013 [Citado el 10 de noviembre del 2018]; N° 733. Disponible en: <https://www.bienmesabe.org/noticia/2013/Octubre/romero>
- 48.** Abramovi H, Terpin P, Generalic I, Skroza D. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. Croat. J. Food Sci. Technol. [Online] 2012 [Cited nov 14; 2018]; 4(1), 1-8. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/233669687> Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary *Rosmarinus officinalis* and vine *Vitis vinifera* leaves

- 49.** Muñoz L. Plantas Medicinales Españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (romero). Departamento de Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca. Stud. bot. [Revista en línea] 2002 [Citado el 14 de noviembre del 2018]; 21(1): 105-118. Disponible en: <http://revistas.usal.es/index.php/0211-9714/article/view/6111/6131>
- 50.** Rodríguez Y, Espinoza S, Vergara M. Efecto inhibitorio *In vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre el crecimiento *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Salud & Vida Sipanense. [Revista en línea] 2014 [Citado el 14 de noviembre del 2018]; 1(2): 63-74. Disponible en: <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/65/64>
- 51.** Azevedo F, Quirino M, Mego R, Bruno A, Silva Z. Aspectos Anatómicos de Plantulas *Foeniculum Vulgare* Mill. Rev. bras. plantas med. [Revista en línea] 2012 [Citado el 14 de noviembre del 2018]; 14: 197-204. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000500013
- 52.** Alba C, Camacho R, Polanco M, Gómez S. Efecto relajante de las hojas de *Ocimum basilicum* y *Foeniculum vulgare* colombianas en íleon aislado de rata. Redalyc. [Revista en línea] 2009 [Citado el 14 de noviembre del 2018]; 50 (1): 98-109. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/2310/231018725008/>

53. Shamkant B, Vainau P, Atmaram B. *Foeniculum Vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *Biomed Res Int*. [Online] 2014 [Cited nov. 14; 2018]; 20(14): 674-842. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137549/>
54. Manzoor R, Bilal D, Shahnwaz S, Bilal B, Mushtaq Q. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab. Jour. of Chemistry*. [Online] 2016 [Cited nov. 14; 2018]; 9(2): S1574-S1583. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535212000792>
55. Palma J. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana. 2009. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=hinojo&id=7703>
56. Kooti W, Moradi M, Ali Akbari S, Sharafi N, Asadi-Samani M, Ashtary D. Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *J. Herb. Med. Pharmacol*. [Online] 2015 [Cited nov. 14; 2018]; 4(1): 1-9. Available in: <http://www.herbmedpharmacol.com/PDF/JHP-4-1.pdf>
57. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6^a ed. México: Interamericana; 2014.
58. Romero: Plantas Aromáticas. Rev. sobre el entorno y la naturaleza Elicriso. Disponible en: http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/romero/
59. PPC. Usos medicinales y aplicaciones curativas del hinojo. 2018. Disponible en: <https://www.plantasparacurar.com/usos-medicinales-y-aplicaciones-curativas-del-hinojo/>

60. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Cuba: Universidad Nacional Ciudad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos; 2002.
61. Centurión V. Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 [Tesis]. Perú: Universidad Antenor Orrego. Facultad de odontología; 2015.
62. Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz. J. Microbiol. [Internet] 2000 [Citado el 14 de nov. del 2018]; 31(4): 247-256. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000400003
63. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. 2013; 33 (1): 1-200. Available in: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=55d77c2f614325f5d38b461b&assetKey=AS:273836702928896@1442299165694>
64. Procedimiento para el manejo de eliminación de residuos biológicos. Universidad católica pontificia de Chile. 2013; 1-7 Disponible en: <http://postgrado.bio.uc.cl/wp-content/uploads/2015/06/manejo-y-eliminacion-de-residuos-biologicos.pdf>

ANEXOS

Anexo 1

Vernier digital marca Mitutoyo, Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper
0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad 17025



Anexo 2

Ficha de Recolección de Datos

Extractos	Efecto antibacteriano (mm)							
	ROMERO		HINOJO		ROMERO+HINOJO		C+	C-
	50%	75%	50%	75%	50%	75%		
Ensayos								
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

Anexo 3

Constancia de taxonomía



Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 005 – 2018- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae.
- Superorden: Asteranae
- Orden: Apiales
- Familia: Apiaceae.
- Género: *Foeniculum*
- Especie: *F. vulgare* Mill.
- Nombre vulgar: "hinojo"

Muestra alcanzada a este despacho por EDER SERGIO QUIPUZCO CRUZ, identificado con DNI N° 70010318, con domicilio legal en calle 8 de Octubre 536, Florencia de Mora - Trujillo; estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis: "Comparación, *in vitro*, del efecto Antibacteriano entre los extractos Hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Foeniculum vulgare* "hinojo" frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175."

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 13 de Febrero del 2018


D. JOSE MOSTACERO LEON
Director del Herbario HUT



cc. Herbario HUT

E- mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com

Constancia de taxonomía



Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 004 – 2018- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- **Clase:** Equisetopsida
- **Subclase:** Magnoliidae.
- **Superorden:** Asteranae
- **Orden:** Lamiales
- **Familia:** Lamiaceae.
- **Género:** *Rosmarinus*
- **Especie:** *R. officinalis* L.
- **Nombre vulgar:** "romero"

Muestra alcanzada a este despacho por EDER SERGIO QUIPUZCO CRUZ, identificado con DNI N° 70010318, con domicilio legal en calle 8 de Octubre 536, Florencia de Mora - Trujillo; estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis: "Comparación, *in vitro*, del efecto Antibacteriano entre los extractos Hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Foeniculum vulgare* "hinojo" frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175."

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 13 de Febrero del 2018


Dr. JOSÉ MOSTACERO LEÓN
Director del Herbario HUT



cc. Herbario HUT

E- mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com

Anexo 4

Constancia de colaboración de Marilú Roxana Soto Vásquez Dra. En farmacia y bioquímica en la ejecución del proyecto de investigación

CONSTANCIA

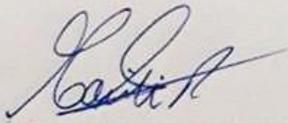
Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727 y acreditada como Docente Investigadora por CONCYTEC.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado en la preparación de la muestra vegetal y de las concentraciones, de los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo, al alumno EDER SERGIO QUIPUZCO CRUZ identificado con DNI 70010318, con domicilio legal en la calle 8 de Octubre # 536, Florencia de Mora – Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas, serán utilizadas para la ejecución de la tesis titulada: "Comparación, *in vitro*, del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Foeniculum vulgare* "hinojo" frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175"

Se expide esta constancia, a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinentes.

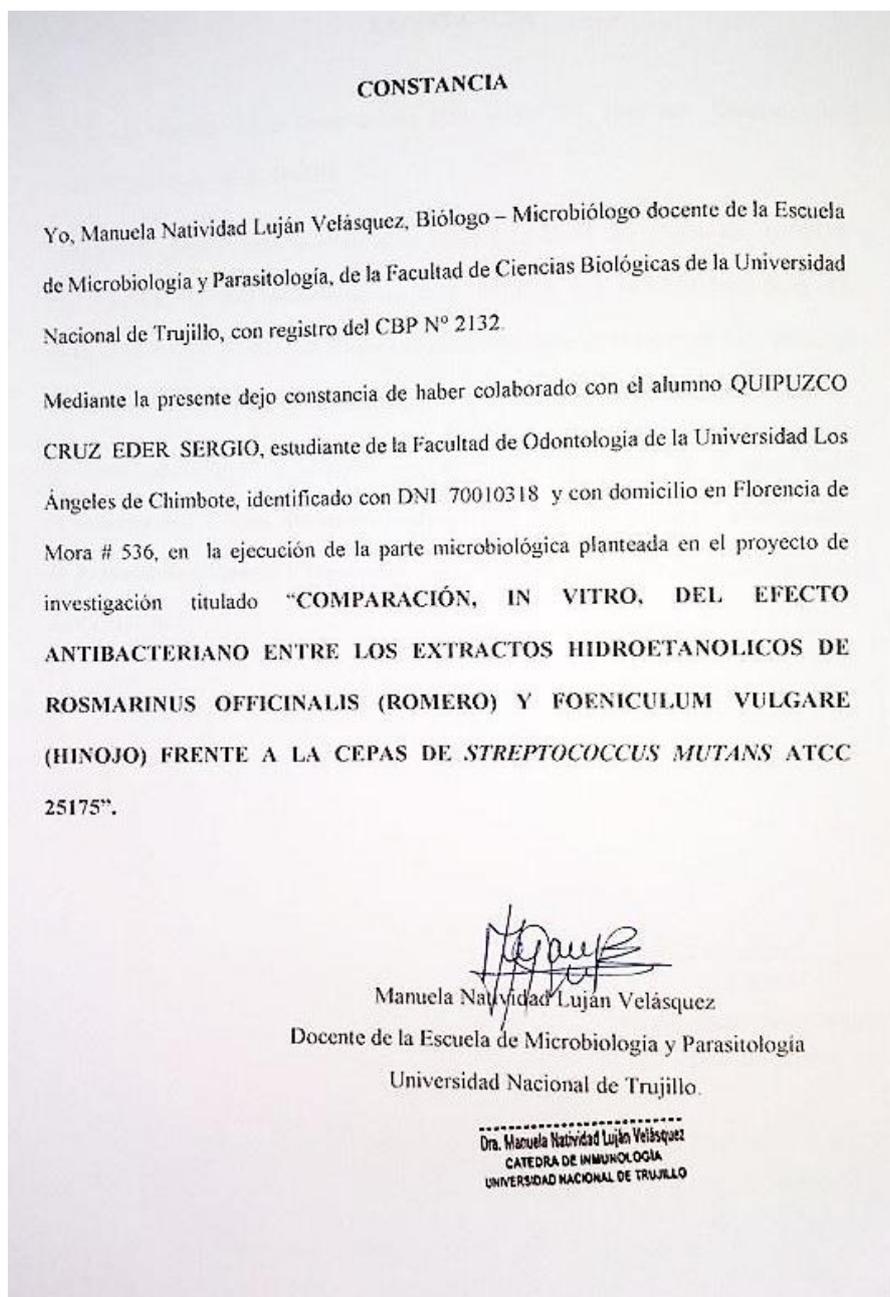
Trujillo, 05 de febrero del 2018.




Dra. MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

Anexo 5

Constancia de colaboración de Manuela Natividad Lujan Velásquez, Biólogo – Microbióloga en la ejecución del proyecto de investigación.



Anexo 6

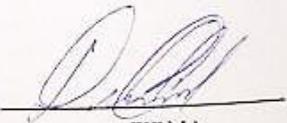
Constancia de colaboración de David Cuba Campos, Ingeniero Estadístico en la ejecución del informe final de investigación.

CONSTANCIA

Yo David Jonatán Cuba Campos con DNI: 45488304, Ingeniero Estadístico de la Universidad Nacional de Trujillo.

Mediante el presente dejo constancia de haber colaborado con el alumno: QUIPUZCO CRUZ EDER SERGIO identificado con DNI 70010318, con domicilio legal en la calle 8 de Octubre # 536, Florencia de Mora – Trujillo, estudiante de la facultad de Ciencias de la Salud , Escuela Profesional de Odontología de la Universidad los Ángeles de Chimbote.

Se hace constar que se colaboró con el análisis estadístico de la tesis titulada: **“Comparación, *in vitro*, del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.”**


FIRMA
David Jonatán Cuba Campos
DNI: 45488304

Anexo 7

RECOLECCIÓN



Se recolectaron las hojas de la Planta *Rosmarinus officinalis* (romero) por la mañana, del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo



Se recolectaron las hojas de la Planta *Foeniculum vulgare* (hinojo) por la mañana, del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo

Anexo 8

Procesamiento de los extractos hidroetanolicos de *Foeniculum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* realizado en la Facultad de Farmacia de la UNT

SELECCIÓN



Se seleccionaron las hojas de la Planta *Foeniculum vulgare* (hinojo)

LAVADO Y DESINFECCIÓN



Se lavaron las hojas de la Planta *Foeniculum vulgare* (hinojo) y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 0,5%

SECADO



Secado a Temperatura Ambiente por 24 horas de las Hojas de la Planta *Foeniculum vulgare* (hinojo)



Pulverización y Tamizado de *Foeniculum vulgare* (hinojo)



200gr. de *Foeniculum vulgare* (hinojo)

SELECCIÓN



Se seleccionaron las hojas de la Planta *Rosmarinus Officinalis* (romero)

LAVADO Y DESINFECCIÓN



Se lavaron y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 0,5% las hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero)

SECADO



Secado a Temperatura ambiente por 24 horas Hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero)



Secado en estufa a 40°C Hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero)



Pulverización y tamizaje de *Rosmarinus officinalis* (romero)



250gr. De polvo de *Rosmarinus Officinalis* (romero)

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE *Foeniculum vulgare* (Hinojo) Y *Rosmarinus officinalis* (Romero)



Etanol diluido al 70° para *Foeniculum vulgare* (hinojo)



Mezcla de Alcohol 96° con Agua Destilada (etanol al 70°) para *Rosmarinus officinalis* (romero)



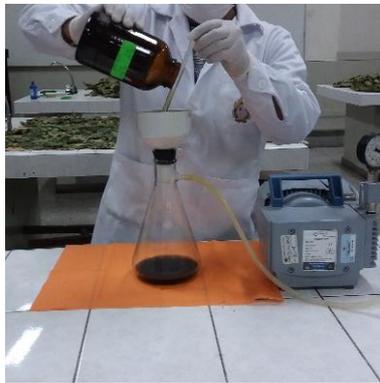
Tiempo de maceración por 7 días frasco *Foeniculum vulgare* (hinojo) y *Rosmarinus officinalis* (romero)



Se agitará cada Frasco de *Foeniculum vulgare* (hinojo) y *Rosmarinus officinalis* (romero) por 15 minutos dos veces al día



Se filtraron los macerados de *Foeniculum vulgare* (hinojo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), al vacío con papel filtro Whatman N° 1



Se filtró el macerado de *Foeniculum vulgare* (hinojo), al vacío con papel filtro Whatman N°1



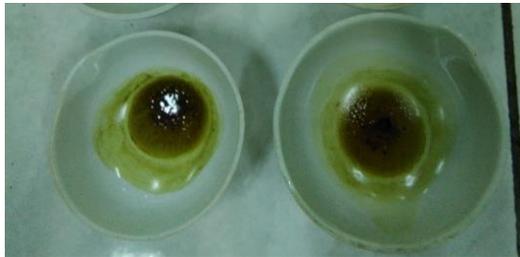
Se filtró el macerado de *Rosmarinus officinalis* (romero), al vacío con papel filtro Whatman N°1



Estufa con circulación de aire forzado a 40°C



Residuo seco de *Foeniculum vulgare* (hinojo)



Residuo seco de *Rosmarinus officinalis* (romero)



Pesando el extracto seco de *Foeniculum vulgare* (hinojo)



Pesando el extracto seco de *Rosmarinus Officinalis* (romero)



Extractos Hidroetanólicos De *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo)

Concentraciones:

Rosmarinus oficinales (Romero) y *Foeniculum vulgare* (Hinojo) de 50% (500 mg/ml) disueltas en etanol de 70°.

Rosmarinus oficinales (Romero) y *Foeniculum vulgare* (Hinojo) de 75% (750mg/ml) disueltos en etanol de 70°.

La mezcla de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Foeniculum vulgare* (Hinojo) en proporción de 1:1; de 50% y 75% de ambos extractos disueltos en etanol de 70°.

Anexo 9

ENFRENTAMIENTO MICROBIOLÓGICO



Cepa Bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fueron obtenidas del Laboratorio de Referencia Gen Lab de Perú S.A.C.

REACTIVACIÓN DE CEPA DE *S. MUTANS* ATCC 25175



Cultivo liofilizado en tubo número 0,5 de Nefelómetro de Mac Farland, con 5ml de caldo Brain Heart Infusión (BHI) o Cerebro Corazón Infusión



Sembrando cultivo liofilizado en tubo número 0,5 de Nefelómetro de Mac Farland, con 5ml de caldo Brain Heart Infusión (BHI) o Cerebro Corazón Infusión

INOCULACION DE LAS PLACAS



Hisopo estéril sumergido en la suspensión



Hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo de la placa

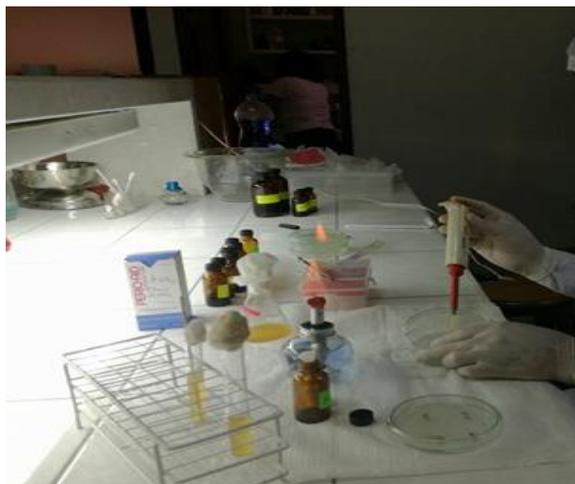
PREPARACION DE LOS DISCOS DE PAPEL FILTRO WHATMAN NÚMERO 3 ESTÉRILES



Preparación de los discos de papel filtro whatman número 3 estériles



Preparación de los discos de papel filtro whatman número 3 estériles, embebidos con 50 ul de cada una de las concentraciones de 50% y 75% del Extracto Hidroetanolico de *Foeniculum vulgare*.



Preparación de los discos de papel filtro whatman número 3 estériles, embebidos con 50 ul de cada una de las concentraciones de 50% y 75% del Extracto Hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero)

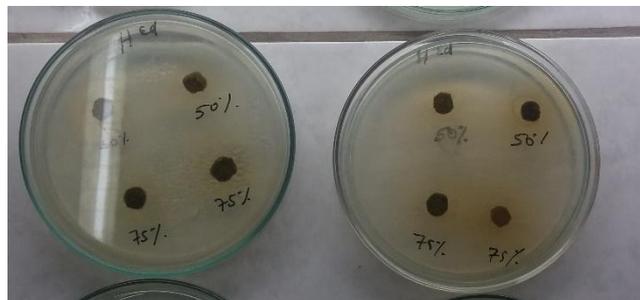
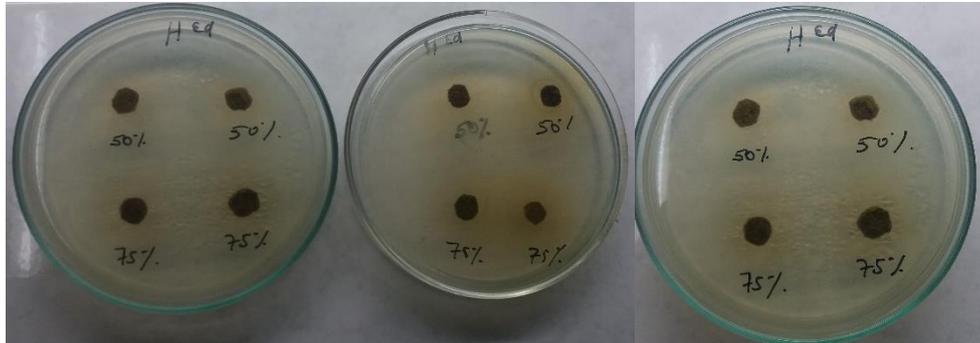


Con una pinza estéril, se colocaron los discos con extracto hidroetanólico de *Foeniculum vulgare* (hinojo) al 50% y 75% sobre las placas de Mueller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Con una pinza estéril, se colocaron los discos con extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 50% y 75% sobre las placas de Mueller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

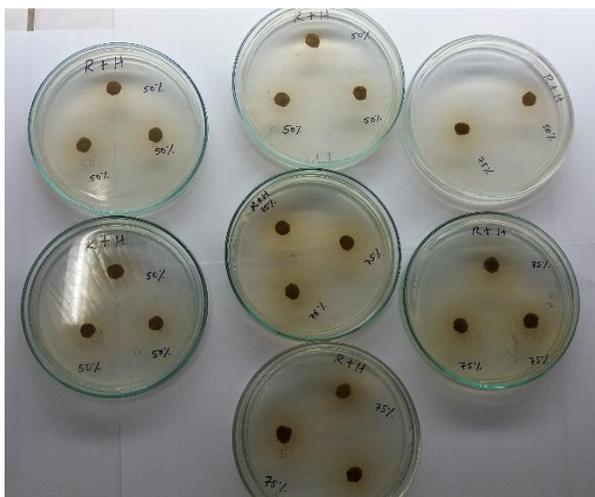
LECTURA DE RESULTADOS



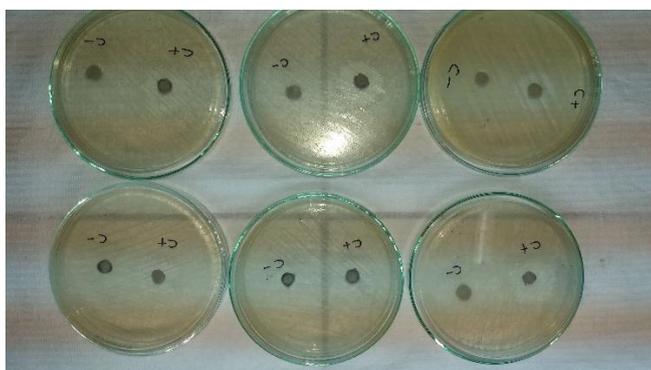
Placas Petri de *Foeniculum vulgare* (hinojo)



Placas Petri *Rosmarinus officinalis* (romero)



Placas Petri del Efecto Sinérgico de *Rosmarinus officinalis* y *Foeniculum vulgare*



Placas Petri del control positivo clorhexidina al 0,12% y control negativo etanol 70%

Anexo 10

Efecto antibacteriano entre los extractos hidroetánolicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Foeniculum vulgare* (Hinojo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer

Extractos	ROMERO (mm)		HINOJO (mm)		ROMERO + HINOJO (mm)		C+ (mm)	C- (mm)
	50%	75%	50%	75%	50%	75%		
Concentraciones								
Repeticiones								
1.	21.2	28.1	17.5	22.8	28.0	29.3	26.5	9
2.	23.0	28.0	18.8	23.0	24.9	30.4	26.3	9
3.	23.4	27.0	19.0	23.1	27.7	32.0	25.0	9
4.	22.8	27.9	19.5	23.0	26.9	29.6	25.7	9
5.	25.0	26.8	20.0	23.4	26.9	29.6	25.3	9
6.	25.4	26.8	20.0	23.5	27.7	30.2	25.1	9
7.	24.1	28.5	19.8	22.9	28.4	29.8	26.4	10
8.	24.1	28.6	17.5	23.0	26.3	30.0	25.9	9
9.	24.0	28.5	17.3	23.2	26.0	30.0	26.1	9
10.	24.8	28.6	18.9	23.5	24.8	31.2	26.2	9

C+= Gluconato de clorhexidina al 0.12%

C- = etanol

Anexo 11

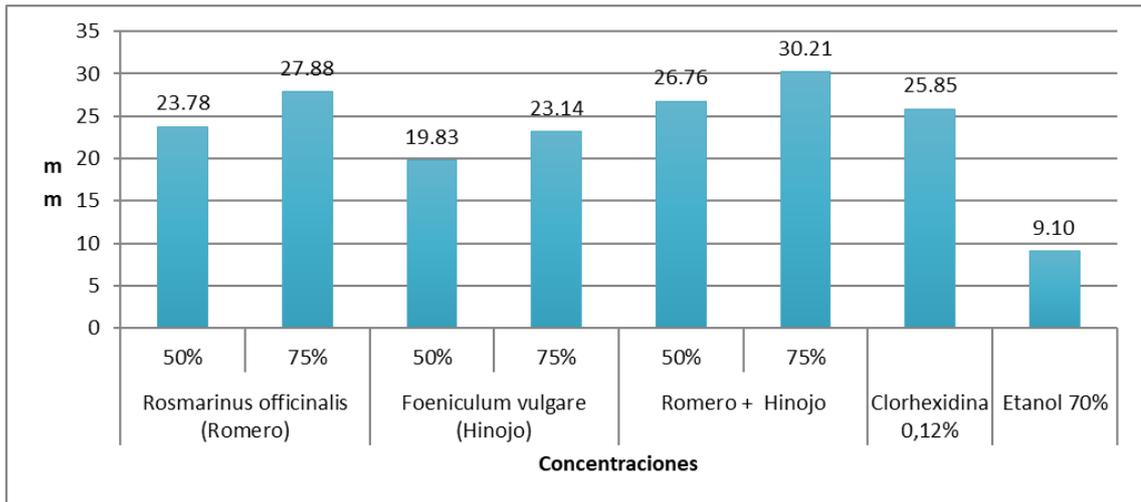
Tabla 3: Prueba de Normalidad

Grupos	Shapiro-Wilk			Distribución Normal
	Estadístico	gl	Sig.	
R-50%	0,946	10	0,616	Normalidad
R-75%	0,909	10	0,274	Normalidad
H-50%	0,885	10	0,147	Normalidad
H-75%	0,902	10	0,231	Normalidad
RH-50%	0,929	10	0,434	Normalidad
RH-75%	0,871	10	0,104	Normalidad
Clorhexidina 0,12%	0,907	10	0,260	Normalidad
Etanol 70%	0,890	10	0,172	Normalidad

Al tener menos de 50 datos por cada extracto y control, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la normalidad de los mismos, donde se observa una distribución normal para todos los datos.

Anexo 12

Gráfico 1. Comparación, *in vitro*, del efecto antibacteriano, entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Fuente: Datos proporcionados por el investigador