



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
HIDROETANÓLICO MIXTO DE *Rosmarinus
officinalis* Y *Thymus vulgaris* SOBRE CEPAS DE
Streptococcus mutans ATCC 25175, TRUJILLO - 2018**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

CIRUJANO DENTISTA

AUTORA

VIGIL CONTRERAS YVIS PAMELA

ASESOR

MGTR. CÉSAR ABRAHAM VÁSQUEZ PLASENCIA

TRUJILLO-PERÚ

2019

TÍTULO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
HIDROETANÓLICO MIXTO DE *Rosmarinus officinalis* Y
Thymus vulgaris SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans*
ATCC 25175, TRUJILLO – 2018**

EQUIPO DE TRABAJO

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Vigil Contreras Yvis Pamela

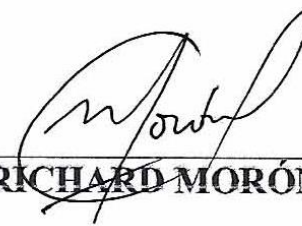
ASESOR

Mgtr. César Abraham Vásquez Plasencia


Hoja de firma del jurado y asesor




Dr. ELÍAS ERNESTO AGUIRRE SIANCAS
PRESIDENTE



Mgtr. EDWAR RICHARD MORÓN CABRERA
MIEMBRO



Mgtr. JUAN LUIS PAIRAZAMÁN GARCÍA
MIEMBRO



Mgtr. CÉSAR ABRAHAM VÁSQUEZ PLASENCIA
ASESOR

AGRADECIMIENTO

El presente proyecto está dedicado a mis padres; Sixto Wilder Vigil campos y Rosa Olivia Contreras Benites por darme las fuerzas para continuar en lo adverso, por guiarme y darme la sabiduría en las situaciones difíciles, por ser los principales promotores de mis sueños, por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas.

Gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme en los días difíciles.

A mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida por apoyarme en cada paso que he dado, en mis decisiones y proyectos trazados por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

A mi hija Danna Gabriela Guevara Vigil mi compañía en cada larga y agotadora noche de estudio, por darme tu amor incondicional, las fuerzas para buscar lo mejor para ti, por ser mi impulso y mi principal motivo para salir adelante y lograr terminar con éxito este proyecto de tesis. Y, gracias por confiar en mí.

RESUMEN

En el trabajo de investigación se tuvo como objetivo comparar el efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones y la combinación del extracto hidroetanólico mixto a base de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175. Se evaluaron concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% en dilución en etanol al 70%. Se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar, se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La reactivación se llevó a cabo sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 ml de Caldo Brain Heart Infusión (BHI), Se realizó 10 repeticiones por cada tratamiento empleando como control positivo clorhexidina al 12% y como control negativo etanol al 70%. En relación a la medición de los halos de inhibición se utilizó la regla Vernier, se aplicó e test de Anova y Duncan, obteniendo como resultado, en las concentraciones del extracto hidroetanólico mixto a base de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) de 25% con un halo de 15.7 mm; 50% con un halo de 21.3 mm; 75% con un halo de 31mm y 100% con un halo de 38.9 mm. Se concluye que la combinación de los dos extractos al 100% presenta mayor efecto antibacteriano con un halo promedio de 38.9 mm superando a la clorhexidina al 0.12% con un halo promedio de 25.7 mm.

Palabras clave: Antibacteriano, *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*, *Thymus*.

ABSTRACT

The objective of the research work was to compare the antibacterial effect of the four concentrations and the combination of the mixed hydroethanolic extract based on *Rosmarinus officinalis* (Romero) and *Thymus vulgaris* (Thyme) on strains of *Streptococcus mutans* ATCC® 25175. Concentrations were evaluated 25%, 50%, 75% and 100% in dilution in 70% ethanol. The lyophilized culture of the *Streptococcus mutans* strain ATCC 25175 was used using the Kirby Bauer method of agar diffusion. Reactivation was carried out by sowing the lyophilized tube culture with 5 ml of Brain Heart Infusion Broth (BHI), 10 repetitions were performed for each treatment using 12% chlorhexidine as a positive control and 70% ethanol as a negative control. In relation to the measurement of the inhibition halos, the Vernier rule was used, the Anova and Duncan test was applied, obtaining as a result, in the concentrations of the mixed hydroethanolic extract based on *Rosmarinus officinalis* (Romero) and *Thymus vulgaris* (Thyme) 25% with a halo of 15.7 mm; 50% with a halo of 21.3 mm; 75% with a halo of 31mm and 100% with a halo of 38.9 mm. It is concluded that the combination of the two 100% extracts has a greater antibacterial effect with an average halo of 38.9 mm, exceeding 0.12% chlorhexidine with an average halo of 25.7 mm.

Keywords: Antibacterial, *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*, *Thymus*.

CONTENIDO

1. Título de tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo	iii
3. Hoja de firma de jurado	iv
4. Hoja de agradecimiento y/o dedicatoria	v
5. Resumen	vi
5. Abstrac	vii
6. Contenido.....	viii
7. Índice de tablas	ix
8. Índice de cuadros	x
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura	4
III. Hipótesis	18
IV. Metodología.....	19
4.1 Diseño de la investigación.....	19
4.2 Población y muestra	19
4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores	21
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	22
4.5 Plan de análisis	27
4.6 Matriz de consistencia.....	28
4.7 Principios éticos	29
V. Resultados.....	30
5.1 Resultados	30
5.2 Análisis de resultados.....	37
VI. Conclusiones.....	39
Aspectos complementarios	40
Referencias bibliográficas.....	41
Anexos	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Comparación del Efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico mixto de Rosmarinus officinalis y Thymus vulgaris</i>	30
Tabla 2 <i>Comparación del Tamaño de los halos de inhibición del Extracto hidroetanólico mixto de Rosmarinus officinalis y Thymus vulgaris</i>	31
Tabla 3 <i>Comparación del Efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de Rosmarinus officinalis sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175</i>	32
Tabla 4 <i>Comparación del Tamaño de halos de inhibición del Extracto hidroetanólico de Rosmarinus officinalis</i>	33
Tabla 5 <i>Comparación del Efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de Thymus vulgaris sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175</i>	34
Tabla 6 <i>Comparación del Tamaño de los halos de inhibición del Extracto hidroetanólico de Thymus Vulgaris</i>	35
Tabla 7 <i>Comparación del Tamaño de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento</i>	36

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 *Comparación del efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico mixto de Rosmarinus officinalis (romero) y de Thymus vulgaris (Tomillo) sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 2517547*

Gráfico 2 *Comparación del efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de Rosmarinus officinalis (Romero) sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 2517548*

Gráfico 3 *Comparación del efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de Thymus vulgaris (Tomillo) sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 251755349*

I. INTRODUCCIÓN

Una de las afecciones orales que más prevalece es la caries dental; enfermedad infectocontagiosa y multifactorial caracterizada por afectar a los tejidos duros de las piezas dentarias causando lesiones producto de la desmineralización que produce su biofilm^{1, 2}. Esta enfermedad se presenta a causa de un desequilibrio producido en la triada ecológica formada por un huésped, agente y ambiente; asimismo es válido indicar que esta enfermedad es evolutiva y va causando a lo largo una infección más crónica como pulpitis reversible, pulpitis irreversible, abscesos dentarios, etc.; estos procesos liberan citoquinas que se liberan en todo el organismo a través de sistema circulatorio como respuesta del sistema inmunológico causando enfermedades cardiovasculares, musculares, partos prematuros entre otros³.

El primordial agente causante de la enfermedad de caries dental es el *S. mutans*, bacteria en forma de coco Gram positiva perteneciente a la cavidad oral, que al ser sometido al desequilibrio ambiental ocasionado por distintos factores logra aumentar en gran cantidad y aumentando sus factores de virulencia convirtiéndola en una bacteria patógena que estará adherida a los tejidos dentales y a su vez va a permitir la adhesión de otras bacterias formando de ese modo el biofilm cariológico^{3, 4}.

El tratamiento actual para la caries dental es la remoción mecánica del tejido infectado, así mismo, se realiza una fase preventiva con elementos de higiene oral con la finalidad de eliminar el mayor número de bacterias^{3, 4}.

Actualmente los productos naturales se están empleando en distintos ámbitos de la salud no siendo ajena la odontología, siendo una de las alternativas más prometedoras

a causa de las eficaces actividades biológicas que se alcanzan desde de sus principios activos que se consiguen a partir de sus metabolitos. En el campo odontológico la caries dental es la que más prevalece siendo de zozobra lo que ha originado una intensa búsqueda de una solución que ayude a revertir o prevenir esta afección. El presente trabajo de investigación se derivó de la línea de Investigación de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, sede Trujillo de la Escuela Profesional de Odontología, Para determinar ¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico mixto a base de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

Se tuvo como objetivo comparar el efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones y la combinación del extracto hidroetanólico mixto a base de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175. Se evaluaron concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% en dilución en etanol al 70%. Se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar, se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La reactivación se llevó a cabo sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 ml de Caldo Brain Heart Infusión (BHI), Se realizó la medición de los halos de inhibición obteniendo como resultado en las concentraciones del extracto hidroetanólico mixto a base de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus* (Tomillo) de 25% con un halo de 15.7mm, 50% con un halo de 21.3mm, 75% con un halo de 31mm y 100% con un halo de 38.9 y se concluye que la combinación de los dos extractos al 100% presenta mayor efecto antibacteriano con un halo promedio de 38.9mm superando a la clorhexidina al 0.12% con un halo promedio de 25.7 mm.

Esta investigación se justificó en que pese a la agregación de algunos antibacterianos a los enjuagues bucales y a las pastas dentales no se ha obtenido otra cosa más que originar resistencia, lo cual ha producido mayor preocupación y se ha optado por incorporar métodos más naturistas para encontrar alternativas de control de la caries dental como es el uso de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo); dos plantas con propiedades: cicatrizantes, antiinflamatorias, antioxidantes pero sobre todo antimicrobianas; por lo que se busca determinar su efecto sobre el *S. mutans* quien es el principal desencadenante de la caries dental a causa de que es el principal colonizador y quien facilita la adhesión de las demás bacterias que formarán el *biofilm cariológico* para lograr controlar el desarrollo y propagación de caries dental con la finalidad de incluir estos productos en los elementos de limpieza y de este modo disminuir la prevalencia de caries dental. Por lo que el objetivo de esta investigación es comparar el efecto antibacteriano de la preparación mixta del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175. Los resultados servirán como base a futuras investigaciones y para contar con nuevos métodos que ayuden en la odontología.

II. REVISION DE LA LITERATURA

2.1 Antecedentes:

Loja M⁵ (Perú 2017) **El trabajo fue determinar el efecto antibacteriano in vitro de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.** Se utilizó el método de difusión de placa (método de difusión en agar), método de microdilución técnica útil para determinar el MIC en un gran número de muestras y espectrofotómetro. Determinado mediante la medida del diámetro de los halos, evidenció un promedio de halo 30 mm para *E. faecalis* así como de 35 mm para *S. mutans* correspondientes al 10%. Se trabajó con dos controles, el control positivo constituido por Gluconato de clorhexidina al 0,12% y el control negativo por alcohol etílico (solvente de extracción del extracto). Los resultados de la presente investigación demuestran que el *Streptococcus mutans* fue más sensible al colutorio elaborado por *Rosmarinus officinalis* (romero) en comparación a los *Enterococcus faecalis*. se determina que a mayor concentración del colutorio con extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) menor es el botón de crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Cueva J⁶ (Perú 2016) **El trabajo determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro**, en el presente estudio experimental se determinó que al 100% muestra acción antibacteriana, se realizó a través del ensayo microbiológico de Agar en pozo, Se consiguió a las 72 horas halos de 38.457 mm ± 11.632 mm, los resultados demostraron que al 100% el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antimicrobiano, dando el efecto inhibidor a las 72 horas; a la concentración de 100%

hubo mayor efecto que el gluconato de clorhexidina al 0.12% y a las 168 horas menor el efecto.

Ortega E ⁷ (Ecuador 2016) El trabajo fue **comprobar la efectividad de inhibición del extracto de tomillo y romero al 10% frente al *Streptococcus mutans*** en 20 muestras, estudio experimental se realizó el análisis in vitro de 20 muestras se midieron los halos de inhibición formadas por ambas soluciones acuosas además del agua destilada y la clorhexidina al 2%, La media del diámetro del halo de inhibición provocado con el extracto de Tomillo fue de 6mm. Este valor se encontró por debajo de 8mm; por tanto, la sensibilidad de la bacteria ante esta sustancia fue nula. De igual forma se analizó el resultado del extracto de Romero, cuyo valor (6 mm) igual estuvo por debajo de 8mm. Por consiguiente, resultó nula la sensibilidad de la bacteria ante este tratamiento. Los resultados, se determinó que ni el extracto de Tomillo ni el de Romero al 10% tuvieron un efecto inhibitorio de la bacteria *Streptococcus mutans*, usando un medio de cultivo que podría semejar las condiciones de la cavidad oral.

Rocha R ⁸ (Perú 2016). El trabajo fue **determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175** en el presente estudio experimental utilizado el método de difusión de discos se observó como resultado que el promedio de halo aumenta cuando la concentración de aceite de romero incrementa, son idénticos en las concentraciones tanto de 100% como de 75%, se alcanzó al 5% halo de 11.9 mm, así como al 100% el halo es de 19.7, siendo mayor al halo promedio de la penicilina procainica el cual obtuvo halo de 17.35 mm . Estos resultados obtenidos indicaron, que además de tener

acción antibacteriana, el aceite de romero a mayor concentración mayor es el efecto antibacteriano.

Marín G. ⁹(Ecuador 2016). El trabajo fue **determinar la efectividad del extracto acuoso de salvia, romero y de salvia-romero al 100% como bactericida sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio microbiológico in vitro**, el objeto de comprobar la eficacia de los extractos acuosos al 100% de *Salvia Officinalis*, de Romero, y de Salvia-Romero en la inhibición del crecimiento del *Streptococcus mutans*, se realizó mediante una muestra de 15 cajas Petri con agar sangre de cordero 5%, 5 cajas Petri por cada extracto. Los resultados fueron que el Efecto bactericida del extracto acuoso de Romero al 100% sobre el *Streptococcus mutans*, tuvo un halo de inhibición mayor de 6.15 mm a las 24 h y de 6.15mm a las 48 h. Los extractos acuosos de Salvia con Romero al 100% sobre el *Streptococcus mutans*, tuvieron un halo de inhibición de 12.60 mm a las 24 horas y de 15.40 mm a las 48 horas, mientras que la acción bactericida del extracto acuoso de Salvia (*Salvia Officinalis*) al 100%, sobre el *Streptococcus mutans*, tuvo un halo de inhibición de 12.45mm a las 24 horas y de 15.35mm a las 48 horas .se concluyó que El Efecto bactericida del extracto acuoso de Romero (*Rosmarinus Officinalis*) al 100% sobre el *Streptococcus mutans*, no mostró un halo de inhibición mayor de 6.15 mm a las 24 y de 6.15mm a las 48 horas. .

Sosa J ¹⁰(Perú 2015) El trabajo fue se **determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis***, en el presente estudio experimental se utilizó la técnica de difusión en disco, los cuales mostraron en sus resultados que en las concentraciones de 25mg/ml, 50mg/ml del extracto alcohólico

de romero hubo efecto antibacteriano sobre ambas bacterias, obteniéndose a la concentración de 50mg/ml halos de 25,5 mm y 32,7 mm, existiendo mayor inhibición en esta concentración para ambas

Se obtuvo un halo de inhibición medio de 26.7 mm en la concentración de 50 mg/ml. Los halos del etanol que se utilizó como disolvente del extracto alcanzaron un término medio de 15.5 mm, en cambio el gluconato de clorexidina al 0.12 % obtuvo halos de inhibición producidos de 16.5 mm para *Streptococcus mutans* y para *Enterococcus faecalis*.

Solano A.¹¹ (Ecuador 2013) El trabajo fue **determinar la evaluación del crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero)**, en el presente estudio experimental utilizaron la técnica de difusión de discos en medio sólido utilizaron dos grupos cada grupo quince muestras cada una de ellas en caja Petri, los resultados obtenidos de halos de inhibición para *Streptococcus mutans*, medidos sin incluir el diámetro de los discos de papel filtro (6mm); asimismo muestra que existe diferencias significativas entre el extracto oleoso con los extractos acuosos y el agua destilada ($p < 0.001$), del mismo modo fue observada esa significancia con la Clorhexidina ($p < 0.001$). lo cual mostraron que el extracto oleoso de *Rosmarinus officinalis* presentó acción antibacteriana, semejante a la clorhexidina, mientras tanto el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* no presentó acción antibacteriana.

2.2 Marco teórico

2.2.1 CARIES DENTAL

2.2.1.1 Definición:

La caries dental es una afección probablemente más prevalente. es un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, como resultado del metabolismo bacteriano encima la superficie dentaria, que con el tiempo produce una pérdida de minerales. *Streptococcus mutans* es uno de los microorganismos cariogénicos vinculado a esta enfermedad.

La caries dental enfermedad multifactorial producida por tres factores principales. ¹

- La microflora incluye las infecciones bacterianas.
- El sustrato incluye la dieta cariogénica.
- El huésped incluye los dientes, higiene bucal, la saliva.
- El tiempo también considerado ya que para la formación de esta enfermedad¹¹

2.1.1.2 Factores del huésped

- El flúor: desempeña un rol importante en la remineralización, porque al mezclarse con los cristales del esmalte forman el fluorapatita, siendo resistente al ataque ácido. Está presente en muy bajas concentraciones en la saliva
- Saliva: previene la formación de la caries ya que contiene proteínas, inmunoglobulinas enzimas y agentesbuffer¹.

2.2.1.3 Factores de virulencia: *Streptococo mutans* en el desarrollo de caries:

- Aciduricidad: En un medio de pH bajo puede producir

- Acidogenicidad: el Streptococo fermenta azúcares de la dieta para originar ácido láctico como producto del metabolismo. sucede cuando el pH disminuye y el esmalte del diente se desmineraliza
- Síntesis de fructanos y glucanos. Los glucanos insolubles ayudan que la bacteria pueda adherirse al diente y luego utilizados de reserva de nutrientes.¹

2.2.2 ROSMARINUS OFFICINALIS (ROMERO)

2.2.2.1 Concepto: *Rosmarinus officinalis* comúnmente conocida como romero es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae cuyo nombre deriva del griego rhops y myrinos que significa arbusto marino; esta planta posee una alta capacidad de adaptación lo que le permite crecer en distintas zonas. Es reconocida por sus grandes metabolitos que poseen lo que le da una actividad biológica potente^{12,13}

2.2.2.2 Características:

- *Rosmarinus officinalis* mide de 0.5 a 2 metros de altura aproximadamente posee tallos prismáticos y leñosos hojas delgadas y pequeñas con forma de espigas verdes o marrones que miden entre 10-36 por 1,2-3,5mm
- Sus pedúnculos son estrelladas
- Tiene un aroma altamente fuerte especiado, canforáceo su sabor es áspero, amargo y picante.^{12,14}

2.2.2.3 Propiedades biológicas:

Romero es popular por sus grandes propiedades biológicas siendo comprobado bajo evidencia científica que es un buen espasmolítico, antiséptico, expectorante,

estimulante del sistema nervioso, colagogo, hepatoprotector, diurético, antiinflamatorio, cicatrizante, analgésico, antioxidante, antiviral y antimicrobiano. ¹⁴

2.2.2.4 Componentes:

Los componentes van a variar en cantidad y calidad según la altura sobre el nivel del mar, suelo y el clima y estos son los ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos; además se han encontrado también dentro de sus componentes canfeno α -pineno, ésteres terpénicos β -pineno, así mismo el cineol, alcanfor, carnosol, isorosmanol, linalol, terpineol, rosmanol, 3-octanona, isobanil-acetato y el β -cariofileno; también los ácidos butilínico, vanílico, caféico, , rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, , betulínico, betulina, α -amirina, ursólico, clorogénico acetato de bornil y β -amirina, borneol, . Además, posee tres peculiares quimiotipos que son cineoliferum, camforiferum y verbenoniferum. ^{12,14}

2.2.2.5 Efecto antimicrobiano

En un estudio se determinó que el extracto etanólico de romero muestra actividad microbiana para bacterias Gram positivas en *L. monocytogenes*, para Gram negativas sobre *S. typhimurium* así como para *S. sonnei*, a diferenciación de otro estudio donde se obtuvo efecto en bacterias Gram positivas en 0.13% para *S. mutans*. ¹⁵

2.2.2.6 Efectos tóxicos

- Produce convulsiones si se ingiere vía oral
- Precaución para pacientes epilépticos
- No usar en cantidades mayores usadas en los alimentos
- No usar durante el embarazo ¹⁶

2.2.2.7 Estudio terapéutico y farmacológico

Estudios in vitro del aceite esencial de romero determinaron que sus principios bioactivos tienen significativas propiedades biológicas. Presentando actividad citotóxica y anti-cancerígena, actividad antioxidante, cambia la fermentación microbiana ruminal y mejoría la reabsorción ósea mas no presenta mejoría la respuesta inmune ¹⁶

2.2.2.8 Capacidad antioxidante del romero

De los extractos de romero se estudió que la actividad antioxidante la cual se da gracia a los ácidos rosmarínico y caféico , estos tienen una función doble como estimulante y antioxidante de la elaboración de prostaglandina E2 y también como inhibidor de la elaboración de leucotrienos B4 en leucocitos polimorfonucleares del ser humano ¹⁶

2.2.3 THYMUS (TOMILLO)

2.2.3.1 Concepto:

Thymus más conocido como tomillo es una planta mediterránea y perteneciente a la familia Lamiaceae; es reconocida desde tiempo muy antiguo ya que se usaba principalmente en la comida como una planta aromática; pero además se empleaba por sus distintos principios activos. ^{17,18}

2.2.3.2 Características:

- *Thymus* crece en zonas frías y áridas
- Mide 40 cm. aproximados,

- Posee tallos leñosos, hojas aovadas y lineares de color blanquecido con pelillos blancos, sus flores son bilabiadas de color rosa
- Es aromática, huele a tierra y timol,
- Posee un sabor un tanto picante mesclado con clavo, alcanfor y menta. ^{18,20}

2.2.3.3 Propiedades biológicas:

Thymus es muy popular por sus potentes propiedades biológicas como espasmolítico, antitusígeno, antifúngico, antihelmíntico, potente digestivo, cicatrizantes, tonificante, drenador renal, y hepatovesicular, anticatarral, astringente, vulnerario, antibacteriano entre otras. ^{19,20}

2.2.3.4 Componentes:

Las propiedades biológicas de *Thymus* son gracias a sus distintos componentes que son: Ácidos (palmítico, oleico, linoleico, nicótico, ascórbico y rosmarínico); aceites esenciales (cienol, timol, borneol, anetol y carvacrol); aminoácidos (glicina, cistina, isoleucina, valina); metales y minerales (aluminio, cobalto, magnesio, calcio, y hierro); alcoholes (linalol y borneol), terpenos (terpinemo, monoterpenos, monoterpenoles y cinemo); flavonoides (derivados de apigenol y luteolol); ácidos fenoles; vitaminas B1, C, manganeso, taninos, saponinas, triperpenoides, esterres terpenicos y serpilina. ^{17,19.}

2.2.3.5 Efecto antimicrobiano

Se realizó un estudio de la prueba antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre *S. aureus* los resultados son semejantes a obtenidos por Zeghad y Merghem, utilizaron aceite esencial de *Thymus vulgaris* al 30%, teniendo como

resultados halos de inhibición de 10 y 15 mm. Al igual, Acosta, en concentraciones de 5 y 10% obtuvo halos de 8 y 20 mm.

Se demostró alto efecto antibacteriano del aceite esencial de tomillo in vitro sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*; la concentración mínima de aceite esencial de tomillo al 1% impidió el crecimiento bacteriano, mientras que las concentraciones de 30% y mayores inhibieron el crecimiento bacteriano.¹⁹

2.2.3.6 Mecanismo de acción del enjuague bucal

Las bacterias *Prophyromonas Gingivalis*, *Actinobacillus*, y bacterias anaerobias es supragingivales así como subgingivales que son las encargadas de producir las inflamaciones de las encías como consecuencia las enfermedades periodontales como la gingivitis y periodontitis lo cual el extracto de tomillo es efectivo frente a estas.²⁰

En la esencia del *Thymus vulgaris* El timol y carvacrol son los que dan la propiedad de antibacteriana, antiinflamatoria y aséptica al enjuague bucal.²⁰

El enjuague bucal desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas interfiriendo con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, disminuyendo los niveles de ATP y la muerte celular.²⁰

Tiene acción antiséptica por lo tanto es una alternativa para eliminar la halitosis.²⁰

También tiene efecto antiinflamatorio porque inhibe la biosíntesis de prostaglandinas, las cuales causan la inflamación y tiene acción anticariogénica por su amplio espectro de acción contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *Streptococcus* *Artemidis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*.²⁰

2.2.3.7 Otros usos:

- Infusión de tomillo se usa en heridas infectadas, herpes, dermatitis, forúnculos, infecciones de piel por hongos, repelente para mosquitos y picaduras de insectos
- Se aplica como uso externo para encías y cuidado de los dientes, aftas e infecciones de la boca.¹⁷

2.2.3.8 Contraindicaciones:

- Personas alérgicas al tomillo no se recomienda el uso
- No se recomienda el uso para embarazadas
- No se usar durante periodos prolongados de tiempo¹⁷

2.2.4 STREPTOCOCCUS MUTANS

2.2.4.1 Concepto:

S. mutans es una bacteria anaeróbica facultativa, Gram positiva que se encuentra en la cavidad oral a partir de la erupción de la primera pieza dentaria. Es la bacteria desencadenante de la caries dental ya que tiene la capacidad de adherirse mediante la síntesis de glucano en tejidos duros y a su vez permitir la integración de los siguientes microorganismo y así formar las lesiones cariosas. Sin embargo *S. mutans* no solo es responsable de la caries dental, sino que también se le ha asociado a otras patologías sistémicas principalmente las cardiovasculares como endocarditis.^{2,21}

2.2.4.2 Morfología:

S. mutans es una bacteria en forma de coco que crece en cadena cuando es cultivada sin embargo cuando este es extraído de la cavidad oral pose forma de bacilo; su figura

varía según el medio al cual es sometido. Por otro lado, posee la capacidad de transformar glucosa, manitol y lactosa convirtiéndolos en ácidos que causaran la desmineralización de los dientes. Por otro lado *S. mutans* en algunos casos suele generar hemólisis^{1, 21}

2.2.4.3 Serotipos:

La prevalencia de los serotipos de *S. mutans* varía según la raza, y ubicación geográfica y según el tipo de serotipo se verá las características y agresividad de la caries dental. Los serotipos de *S. mutans* van desde serotipo a hasta h; siendo los serotipos c, e y los que se consideran cariogénicos.^{22,23}

2.2.4.4 Factores de virulencia:

Los factores de virulencia son los que permite a una bacteria sobrevivir y colonizar; en el caso de *S. mutans* sus factores de virulencia le permiten producir la enfermedad de caries dental. Uno de los principales es la producción exopolisacáridos a partir de enzimas como fructosiltransferasas y glucosiltransferasa que producirán fructanos y glucanos respectivamente que les permitirán adherirse al diente y permitirán la adhesión de otros microorganismos. Otro factor de virulencia de gran importancia es la capacidad de *S. mutans* para formar bacteriocinas mutacinas que se encargaran de eliminar otros microorganismos y así ayudada a establecer un mayor número de colonias.^{23,24,25}

2.2.4.5 Clasificación:

Se clasifican en ocho serotipos en base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular

- *Streptococcus sobrinus* “serotipos d y g”
- *Streptococcus ferus* “serotipo C”
- *Streptococcus rattus* “serotipo b”
- *Streptococcus macacae* “serotipo c”
- *Streptococcus mutans* “serotipos c, e ,f , k”
- *Streptococcus downei* “serotipo h”
- *Streptococcus cricetus* “serotipo a”

Los *S mutans* serotipo c el tipo predominante en la cavidad bucal conocido como patógeno dental ¹

2.2.4.6 Medios de cultivo

No existe un solo método de cultivo para examinar la variable y compleja placa dental que satisfaga todas las condiciones necesarias.

En la actualidad para el aislamiento de *Streptococcus mutans* solo existen 5 medios de cultivo: ¹

- Agar Mitis Salivarius con bacitracina y kanamicina (MSKB)
- Agar Tripticasa de soya con sacarosa y bacitracina (TYS20B)
- Agar Mitis salivarius con bacitracina (MSB)
- Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina(GSTB)

- Agar triptona extracto de levadura cisteína con sacarosa y bacitracina (TYCSB).

El medio más utilizado para aislar *S. mutans* y otras especies orales de estreptococos es el agar MS el cual ha modificado para ser más selectivo en el aislamiento de *S. mutans* agregando tanto sulfonamida (Agar MC), bacitracina (Agar MSB), polimixina o aun sacarosa (MS40S).¹

- Transmisión, Colonización y estabilidad de *Streptococcus mutans* en cavidad oral
- En los primeros años de vida La transmisión de *S. mutans* es producida por:
- Transmisión vertical: se produce por un contacto directo madre a hijo
- Transmisión horizontal: se produce por el contacto con otros familiares, hermanos, padre y personas cercanas

Factores que proponen que *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa pre dental:

- Después de la erupción dental ciertos niños desarrollan lesiones cariosas. La colonización temprana de la cavidad oral (antes de la erupción dental) por *S. mutans* incrementan el riesgo de caries y que su desarrollo se produzca a edades tempranas.
- *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son capaces de colonizar superficies mucosas.¹

III. HIPÓTESIS.

El extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

IV. METODOLOGÍA

4.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:

4.1.1 Experimental, porque se manipula la variable independiente para su efecto en la variable dependiente y así obtener su resultado. ²⁶

4.1.2 Prospectivo, porque los datos se planifican y se va regular en la medida que va ocurriendo el fenómeno teniendo control de medición. ²⁶

4.1.3 Transversal, Porque recolectan los datos una sola vez. ²⁶

4.1.4 Analítico. Porque explican la causa y el efecto de un determinado fenómeno lo que trata de evaluar la relación entre las variables y las compara. ²⁶

4.2 Población y muestra

4.2.1 Población.

La población estuvo constituida por el conjunto de placas Petri que contenían las diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero), del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo), de la preparación mixta del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) y de las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 cultivadas en laboratorio.

➤ CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de inclusión:

- Placas Petri sembradas con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Criterios de exclusión:

- Placas Petri con halos de inhibición no muy claros
- Placas Petri que se contaminan durante el tratamiento

Muestra

- El tamaño de muestra para el presente estudio fue determinado por la fórmula siguiente:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot 2s^2}{(x_1 - x_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$; para un $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} = 0.84$; para un $\beta = 0.20$

$S = 0.8 (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$ el cual es un valor asumido por no estar definidos los valores paramétricos en estudios similares.

Luego Reemplazando obtenemos:

$$n = 10 \text{ placas Petri}$$

Luego la muestra estuvo conformada por $n = 10$ placas Petri para cada tratamiento.

Cepas de *S. mutans* ATCC 25175; con un total de 40 placas Petri.

4.3 Definición y operacionalización de variables

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Valores y Categorías	Tipo	Escala de Medición
Efecto antibacteriano (variable dependiente)	<i>Streptococcus mutans</i> es una bacteria quien constituye la primera causa de caries dental debido a que es el primer colonizador y quien permite la colonización de las próximas bacterias que formaran el biofilm cariologico.	Efecto en el cual tras la aplicación de extracto hidroetanólico mixto de tomillo y romero va a repercutir impidiendo el crecimiento del <i>S. mutans</i>	Halo de inhibición	mm	Cuantitativo	De razón
Extractos (variable Independiente)	Se denomina extracto a un elemento que se obtiene mediante la técnica de extracción de una materia usando un solvente.	Extracto a base de la combinación de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) que logre el mayor efecto antimicrobiano ya sea de forma individual o en combinación.	Concentración 25%, 50%, 75% y 100%	Extracto hidroetanólico mixto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo). Extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) Extracto hidroetanólico de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo).	Cualitativo	Ordinal

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

4.4.1 Técnica

Observación microbiológica

4.4.2 Instrumento

- Para medir los halos de inhibición de cada tratamiento se utilizó una regla Mitutoyo digital Vernier caliper 0 150 mm /0,01 mm métrico/pulgada calibre 196-500-30 con ISO de calidad 17025 (anexo 13)
- Para obtener la recolección de datos después de haber realizado el enfrentamiento microbiológico se utilizó una ficha de datos (Anexo 10 y 11)

4.4.3 Procedimientos

a. De la obtención e identificación taxonómica de las especies vegetales

- Se recogieron 2 kg de hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*(Tomillo) de una organización o institución que certificó que las plantas son orgánicas. (Anexo 4,5,14 y 15)
- Luego un ejemplar completo de cada una de las especies vegetales se llevó al Herbarium Truxillense para su identificación taxonómica. (Anexo 8 y 9)

b. De la preparación de la muestra vegetal

Selección: Cada una de las muestras vegetales recolectadas fue transportada a la Universidad Nacional de Trujillo a la Facultad de Farmacia y Bioquímica en el laboratorio de Farmacognosia. (Anexo 6)

Lavado: Luego se procedió a lavar cada una de las hojas con agua destilada y luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5%. (Anexo 16,17)

Secado: Las hojas de ambas muestras vegetales fueron colocadas en papel Kraft, y fueron a secadas en una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 C) por 48 horas. (Anexo 19,20,21,22)

Pulverización: Las hojas de ambas muestras vegetales fueron pulverizadas con ayuda de un mortero. (Anexo 23)

Tamizaje: Luego las hojas de ambas muestras vegetales, fueron tamizadas a través del tamiz de malla N° 20, (Anexo 24)

Almacenamiento: El polvo de las hojas de ambas muestras vegetales fue guardado en sus respectivos frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha. (Anexo 26)

c. Preparación de los extractos hidroetanólicos de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo) y la preparación mixta de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo)

Se pusieron 100 g de hojas secas, pulverizadas y tamizadas de romero y tomillo, en sus respectivos recipientes de vidrio color ámbar y de boca ancha. Después, se agregó etanol de 70° G.L. hasta cubrir la muestra 2 cm encima de altura. Se combinó, considerando que la combinación debe abarcar como máximo las $\frac{3}{4}$ partes de los recipientes. Se taparon los recipientes y se maceraron durante 7 días, agitándose dos veces al día durante 15 minutos. (Anexo 25)

Terminado el tiempo de maceración, se filtró el macerado utilizando una bomba de vacío, con papel de filtro Whatman N° 1. Al líquido filtrado se le llamó extracto hidroetanólico.

Luego, cada extracto hidroetanólico se concentró en un rotavapor hasta alcanzar una masa siruposa. Esta masa se llevó a secar a la estufa a 40 °C. Al producto resultante se le llamó extracto seco. De estos resultados se preparó las concentraciones de 25%,

50%, 75% y 100% disueltas en etanol de 70 ° G.L., los extractos hidroetanólicos de cada muestra fueron guardados en recipientes de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8 C) hasta su uso: (Anexo 27)

d. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (romero) Y *Thymus vulgaris* (tomillo) y de la preparación mixta de ambos extractos sobre cepas *Streptococcus mutans* atcc 25175

➤ Reactivación de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175.

Para el presente estudio se empleó cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La reactivación se llevó a cabo sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 ml de Caldo Brain Heart Infusión (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, después se incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar TSYB e incubo a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia. Luego se seleccionó una colonia compatible con *Streptococcus* y se realizó coloración gram.

Desde una colonia se sembró en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), y se preservó hasta su utilización.

PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO) Y EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *Thymus vulgaris* (TOMILLO) Y DE LA COMBINACION MIXTA DE AMBOS EXTRACTOS

A partir del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) y de la preparación mixta de extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y extracto hidroetanólico de

Thymus vulgaris (Tomillo) se prepararon las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente. (Anexo 26)

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO MEDIANTE EL MÉTODO DE KIRBY BAUER.

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

Para lo cual se procedió de la siguiente manera: (Anexo 28)

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE *S. mutans* ATCC 25175.

La cepa de *Streptococcus 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) (Anexo 29)

INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó 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 la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido. (Anexo 30)

PREPARACIÓN DE LOS DISCOS CON LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO) y de *Thymus vulgaris* (TOMILLO).

Se prepararon discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con 50 ul de cada una de las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% del extracto hidroetanólico de romero; 25%, 50%, 75% y 100% de extracto hidroetanólico de tomillo. Luego, con una pinza estéril, fueron colocados los discos sobre las placas de Mueller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Se empleó como control positivo Gluconato de clorhexidina al 0.12% y como control negativo etanol al 70%.

INCUBACIÓN:

Se incubó 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.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Después del tiempo de incubación a 48 horas se examinó cada placa se midió los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco. Para lo cual se utilizó regla milimetrada (VERNIER), abarcando el diámetro del halo.

Se realizaron 10 repeticiones de cada ensayo. ²⁷(Anexo 32,33)

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HDROETANOLICO MIXTO DE *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* SOBRE CEPAS *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Para evaluar la acción mixta o sinérgica del extracto hidroetanólico de romero y de tomillo se emplearon combinaciones de varias concentraciones tanto del extracto hidroetanólico de romero y tomillo, mediante el método de Kirby Bauer. Estas mezclas se probaron frente a *S. mutans* teniendo en cuenta la metodología de Al Walli et al.²⁸ Luego, a cada uno de los tubos de ensayo se le adicionó una alícuota de 20 µL de la suspensión de la levadura a una concentración semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland y se homogenizó suavemente. Se llevó a incubación a 37°C por 48 horas.

Se realizaron 10 repeticiones de cada una de las concentraciones

4.5 Plan de análisis

Para estudiar la información se hicieron tablas de resumen con sus medias y desviaciones estándar además de gráficos para presentar los resultados de la investigación.

Para comparar el efecto antibacteriano, del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo) se hicieron análisis de varianza para un diseño completamente al azar y pruebas de comparaciones múltiples, se aplicó la prueba de Anova y Duncan complementándose con las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk en ambos casos las pruebas estadísticas tuvieron un nivel de significancia del 5%.

Se contó además con el apoyo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel y el programa Statgraphics Centurion.

4.6 Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Población
¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico mixto a base de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	<p>a. Objetivo general: Comparar el efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones y la combinación del extracto hidroetanólico mixto a base de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> TCC® 25175</p> <p>b. Objetivos específicos: -Comparar el efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico a base de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 -Comparar el efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico a base de <i>Thymus</i> (Tomillo) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p>	Si existe efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico a base de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) sobre cepas de <i>Streptococcus Mutans</i> ATCC 125175	<p>Tipo de investigación Es una investigación de tipo cuantitativo.</p> <p>Nivel de investigación Es una investigación de nivel explicativo.</p> <p>Diseño de la investigación Experimental, prospectivo, transversal, analítico.</p>	La población Estuvo constituida por el Conjunto de Placas Petri que Contenían las diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero), del extracto hidroetanólico de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo), del Extracto hidroetanólico mixto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y del extracto hidroetanólico de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) y de las cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 cultivadas en laboratorio <p>Muestra: La muestra Estuvo constituida por 10 repeticiones por grupo.</p>

4.7 Principios éticos

El presente trabajo no muestra problemas éticos, ya que las variables que intervienen en la investigación son adquiridas por el investigador, como son las soluciones y microorganismos a investigarse, y no existe la participación de pacientes, razón por la cual el estudio es IN VITRO que se realizó en placas. Sin embargo, se solicitó la exclusión de ser evaluado por Comité Institucional de Ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote y se tuvo en cuenta los principios de manipulación de muestras y desechos del Manual de Bioseguridad según normas de la OMS. Los cultivos micóticos usados en la investigación fueron tratados en autoclave (método físico de eliminación de microorganismos antes de ser eliminados como residuos biocontaminados).

V. RESULTADOS

5.1 Resultados

Tabla 1. Comparación del Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*

Grupos de tratamiento	N	Promedio	Desv. Estándar	F _(ANVA)	p
25%	10	15.7	1.77		
50%	10	21.3	2.36		
75%	10	31	2.49		
100%	10	38.9	1.20	373.12	0.0000

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa diferencias estadísticas entre los grupos de la preparación mixta del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

($p < 0.001$).

Tabla 2 Comparación del Tamaño de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento del Extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris*(Tomillo).

Grupos de Tratamiento	Subconjunto para $\alpha= 0.05$					
	N	1	2	3	4	5 6
Etanol 70%	10	8.6				
25%	10		15.7			
50%	10			21.3		
Clorhexidina 0.12%	10				25.7	
75%	10					31
100%	10					38.9

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa que todos los extractos presentan efecto distinto, a mayor concentración mayor efecto antibacteriano, teniendo mayor efecto antibacteriano el extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris*(Tomillo) al 100%.

Tabla 3 Comparación del Efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Grupos de tratamiento	N	Promedio	Desv. Estándar	F _(ANVA)	p
25%	10	10.4	1.07		
50%	10	16.8	1.75	246.02	0.0000
75%	10	25.3	2.21		
100%	10	33.8	2.78		

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa diferencias estadísticas entre los grupos de la preparación mixta del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.($p < 0.001$).

Tabla 4 Comparación del Tamaño de halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento del Extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis*(Romero).

Grupos de Tratamiento	N	Subconjunto para $\alpha= 0.05$					
		1	2	3	4	5	6
Etanol 70%	10	8.6					
25%	10		10.4				
50%	10			16.8			
75%	10				25.3		
Clorhexidina 0.12%	10					25.7	
100%	10						33.8

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa que todos los extractos presentan efecto distinto, a mayor concentración mayor efecto antibacteriano, teniendo mayor efecto antibacteriano el extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 100%.

Tabla 5 Comparación del Efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Grupos de tratamiento	N	Promedio	Desv. Estándar	F _(ANVA)	p
25%	10	11.2	1.62		
50%	10	18.8	1.03	183.70	0.0000
75%	10	23.8	1.23		
100%	10	30.6	3.06		

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa diferencias estadísticas entre los grupos de la preparación mixta del extracto hidroetanólico mixto de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.($p < 0.001$).

Tabla 6 Comparación del Tamaño de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento del Extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris*(Tomillo).

Grupos de Tratamiento	Subconjunto para $\alpha= 0.05$						
	N	1	2	3	4	5	6
Etanol 70%	10	8.6					
25%	10		11.2				
50%	10			18.8			
75%	10				23.8		
Clorhexidina 0.12%	10					25.7	
100%	10						30.6

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa que todos los extractos presentaron efecto distinto, a mayor concentración mayor efecto antibacteriano, teniendo mayor efecto antibacteriano el extracto de *Thymus vulgaris*(Tomillo) al 100%.

Tabla 7 Comparación del Tamaño de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento.

Grupos de Tratamiento	n	Subconjunto para $\alpha= 0.05$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Etanol 70%	10	8.6													
romero 25%	10		10.4												
tomillo 25%	10			11.2											
Tomillo y Romero 25%	10				15.7										
romero 50%	10					16.8									
tomillo 50%	10						18.8								
Tomillo y Romero 50%	10							21.3							
tomillo 75%	10								23.8						
romero75%	10									25.3					
Clorhexidina 0.12%	10										25.7				
tomillo 100%	10											30.6			
													31		
Tomillo 75%	10														
romero 100%	10													33.8	
romero y tomillo 100%	10														38.9

FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Todos los extractos presentaron efecto distinto, a mayor concentración mayor efecto antibacteriano, teniendo mayor efecto antibacteriano el extracto hidroetanólico mixto de romero y tomillo al 100%.

5.2 Análisis de resultados

En esta investigación se determinó el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* sobre cepas

Streptococcus mutans atcc 25175. Los resultados demostraron que hubo efecto antibacteriano en todas las concentraciones. Observándose diferencias estadísticas significativas, con un promedio creciente en los halos de inhibición. Para la medición de los halos se utilizó una regla vernier digital y para la recolección de datos después de haber realizado el enfrentamiento microbiológico se utilizó una ficha de datos.

Se evaluaron cuatro concentraciones (25%,50%,75%,100%), a mayor concentración utilizada de la preparación mixta del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mayor fue el efecto antibacteriano.

Debido a la formación de halos de inhibición del crecimiento superior al control positivo clorhexidina 0.12%, estos estudios concuerdan con la tesis de Loja M⁵. En el cual el efecto antibacteriano in vitro de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Se concluyó que tenía efecto antibacteriano debido a la formación de los halos de crecimiento que fueron mayores al control positivo clorhexidina 0.12%, a mayor concentración del colutorio con extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) menor es el botón de crecimiento de *Streptococcus mutans*. Igual que presenta mayor efecto antibacteriano a mayor concentración. Por otro lado se evidencia similitud con el estudio de Rocha R¹⁰, quien determinó el Efecto antibacteriano in vitro del aceite

esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 .observándose que a mayor concentración de aceite esencial de Romero hubo aumento de los promedios de los halos de inhibición de crecimiento antibacteriano del *Streptococcus mutans*, concluyendo al igual que el presente estudio, que no solo presenta efecto antibacteriano ,sino que también a mayor concentración mayor es el efecto antibacteriano; considerando que las concentraciones utilizadas fueron semejantes. Así mismo coincide Turca.T ²⁹ En su estudio determinó la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* contra microorganismos presentes en la flora salival .en los resultados se encontró estadísticamente diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos se encontraron halos de inhibición mayores a 9,5 mm con diámetros promedios que varían entre 12,47 a 20,56 mm; como máximo halo de inhibición 32 mm: al igual que en el presente estudio se observa que los diámetros de los halos aumentan según aumente la concentración, con un máximo halo de inhibición de 33.8 mm del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* frente al del *Streptococcus mutans* .Por otro lado Marín G ³²,en su investigación concluyó que el extracto acuoso de romero aplicado al 100% en una cepa de *S. mutans* no mostró un halo mayor a 6.15mm sobre el *Streptococcus mutans*, a diferencia del presente estudio ese obtuvo efecto antibacteriano con un halo de 33.8mm debido a que los Extractos Acuosos son extractos líquidos cuyo solvente es el agua, por lo cual presentan menor efecto que los extractos hidroetanólicos.

VI. CONCLUSIONES

- Todas las concentraciones del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) presentan efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- Todas las concentraciones del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) presentan efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- Todas las concentraciones del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) presentan efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS:

- Tomar en cuenta el estudio realizado para que puedan servir como bases para futuros productos odontológicos, ya que la preparación mixta del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) muestra un alto efecto antibacteriano.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínima Bactericida (MBC) y Mínima Inhibitorias (MIC) del extracto hidroetanólico *Thymus vulgaris* (Tomillo) y del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero)
- Realizar estudios del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) para que puedan servir como bases para futuros productos odontológicos, ya que son pocos los estudios realizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. Streptococcus mutans y caries dental. CES odontol. (Internet).2013 (citado el 25 de febrero del 2017); 26(1): 44-56. Disponible en: http://www.academia.edu/22597716/Streptococcus_mutans_and_dental_caries
s_Streptococcus_mutans_y_caries_dental
2. Yang Y, Park BI, Hwang EH, You YO. Composition Analysis and Inhibitory Effect of Sterculia lychnophora against Biofilm Formation by Streptococcus mutans. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 2016:8163150.
3. Escribano M, Matesanz P BA. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. Avances en Periodoncia e Implantología Oral. 2005; 17(2):79–87.
4. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiological reviews. 1980 Jun; 44(2):331–84.
5. Loja M. Efecto antibacteriano in vitro de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Pimentel: Universidad Señor de Sipán; 2017.
6. Cueva J. Determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2017.
7. Ortega E. efectividad de inhibición del extracto de tomillo y romero al 10% frente al *Streptococcus mutans* en 20 muestras [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Quitol: Universidad central del Ecuador; 2016.

8. Marín G. Efectividad del extracto acuoso de salvia, romero y de salvia-romero al 100% como bactericida sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio microbiológico *in vitro* [tesis, para obtención del grado académico de odontóloga]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2016.
9. Sosa J. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Pimentel: Universidad Señor de Sipán; 2015.
10. Solano X, Moya T, Zambrano M. Rev Odont. (Internet). 2016 (citado el 25 de mayo del 2018 May); 19(2): 29-34. Disponible en: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/PC%2006/Mis%20documentos/Downloads/tesis2.pdf>
11. Rocha R. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis para optar el grado de bachiller en estomatología]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
12. Avila R, Rhode A, Vera O, Dávila R, Melgoza N, Meza R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar. 2011; 15(43): 23-36.
13. Fung Y, Molina J, Ramírez E, Gómez L, Quiñones J, Ferrer A. et. al. Evaluación Cualitativa De Monoterpenos En *Rosmarinus officinalis* Cultivados Con Agua Tratada Magnéticamente. Cultivos Tropicales. 2016; 37: 136-141.
14. Muños L. Plantas Medicinales Españolas. *Rosmarinus Officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero) Stud. bot. 2002; 21: 105-118.

15. Hader I, Castaño P, Gelmy C, José E, Zapata M, Silvia L, Jiménez R. actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* sobre algunas bacteria de interés alimentario. Rev redalyc (Internet). 2010 (citado el 25 de mayo del 2018 May); 17(2): 149-154. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/1698/169815396006/>
16. Avila R, Navarro A, Vera O, Romero (Rosmarinus officinalis L.): una revisión de sus usos no culinarios. Umar.mx. [Internet]. 2013 [cited 18 February 2019]. Available from: <http://www.umar.mx/revistas/43/0430103.pdf>
17. Rovetto G, Moreno N, Bolívar V, Calvo S, Suárez G, Justiniano C. et al. Aplicaciones Medicinales Del Tomillo. Univ. Cienc. Soc. (Internet) 2010 (citado el 09 de mayo del 2017); 1(2): 16-20. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S8888-88882010000100004&lng=es.
18. Guerrero L, Ruiz L, Rodríguez M, Soto M, Castillo A.. Efecto del cultivo hidropónico de tomillo (*Thymus vulgaris L.*) en la calidad y rendimiento del aceite esencial. Revista Chapingo. 2011; 17(2): 141-149.
19. Gimeno J. Tomillo (*Thymus vulgaris L.*); Medicina Naturista. 2001; 3: 173-175.
20. Montero M, Mira J. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. Rev Inv Vet (Internet). 2018 (citado el 2 de julio del 2018 Jul); 29(2): 588-593. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/14520/12839>
21. Porte L, Braun S, Dabanch J, Egaña A, Andrighetti D. *Streptococcus mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. Rev. chil. infectol. (Internet). 2009 (citado

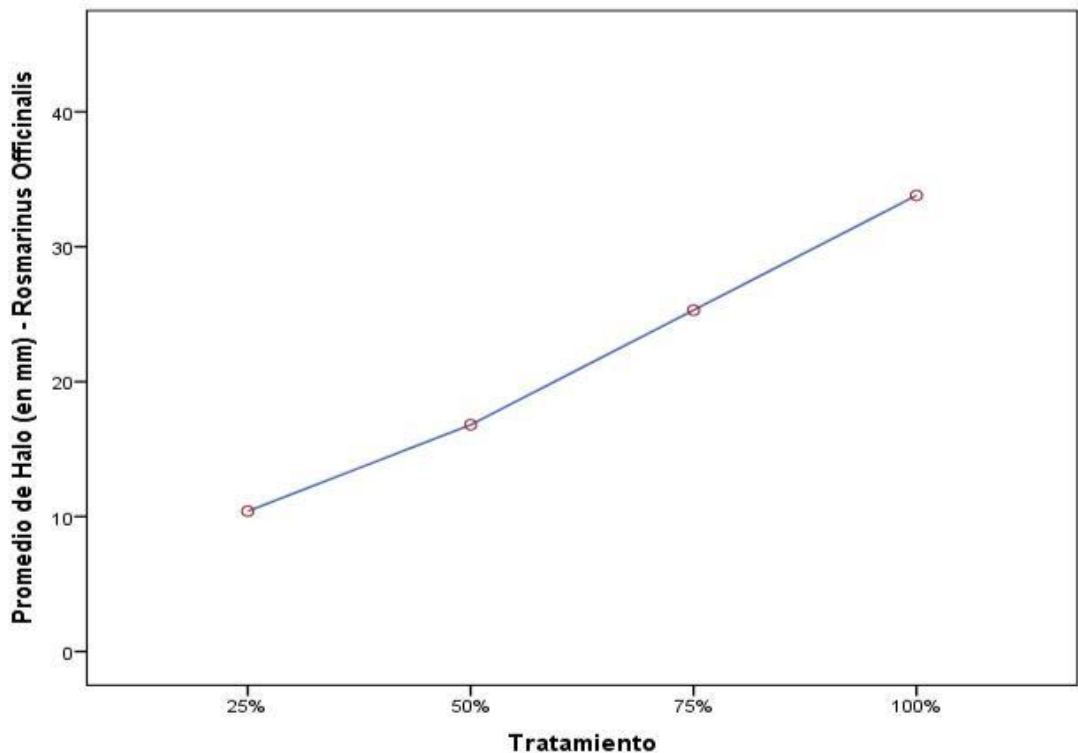
- el 25 de febrero del 2017 Feb); 26(6): 571-571. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000700017&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000700017>.
22. Kim D, Hwang G, Liu Y, Wang Y, Singh AP, Vorsa N, Koo H. Cranberry Flavonoids Modulate Cariogenic Properties of Mixed-Species Biofilm through Exopolysaccharides-Matrix Disruption. PLoS One. 2015 Dec 29; 10(12).
 23. Loesche W. Role of *S. mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986; 50(4): 353–380.
 24. Gamboa F. Identificación y caracterización, microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. Univ Odontol.2014; 33(71): 65-73.
 25. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Inhibition of *S. mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(5):782-9.
 26. Hernandez Sampieri R, Fernandez Collado C, Baptista Lluicio M. Metodología de la investigación. 5ta, ed, McGraw-Hill, Mexico, D, F, 2010, PAG656,
 27. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute); M100-S23. 2013;33 (1).1-197
 28. Waili, A; Ghamdi, M. Ansari, y Salom k. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. Int J Med Sci. 2012; 9(9):793-800.

29. Turca T. Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* contra microorganismos presentes en la flora salival [Tesis, para obtener el título de cirujano dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.

ANEXOS

Anexo 1

Gráfico 1. Comparación del efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico mixto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



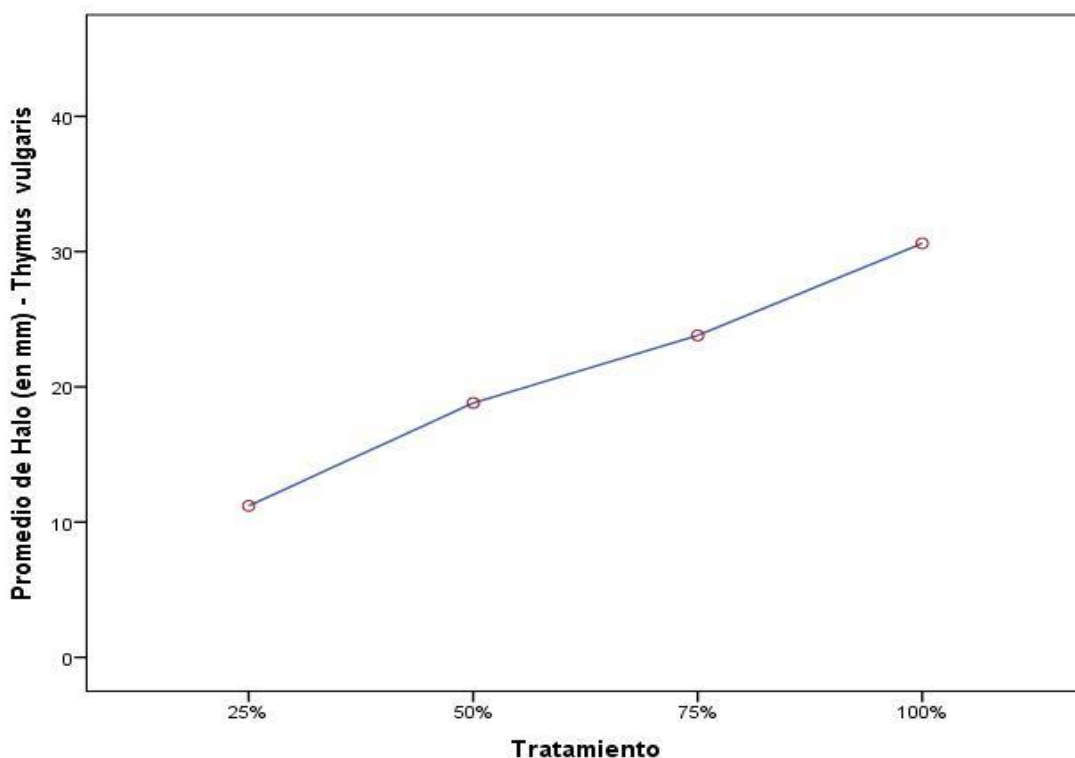
FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa los promedios del halo de inhibición de las concentraciones del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero), se observa efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en todas la concentraciones .Al 25% 10.mm, 50% 16,8 mm, 75% 25,3mm, 100% 33,8 mm. Los resultados obtenidos indican a mayor concentración mayor efecto antibacteriano.

Anexo 2

Gráfico 2.

Comparación del efecto antibacteriano las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico del *Rosmarinus officinalis*(Romero) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

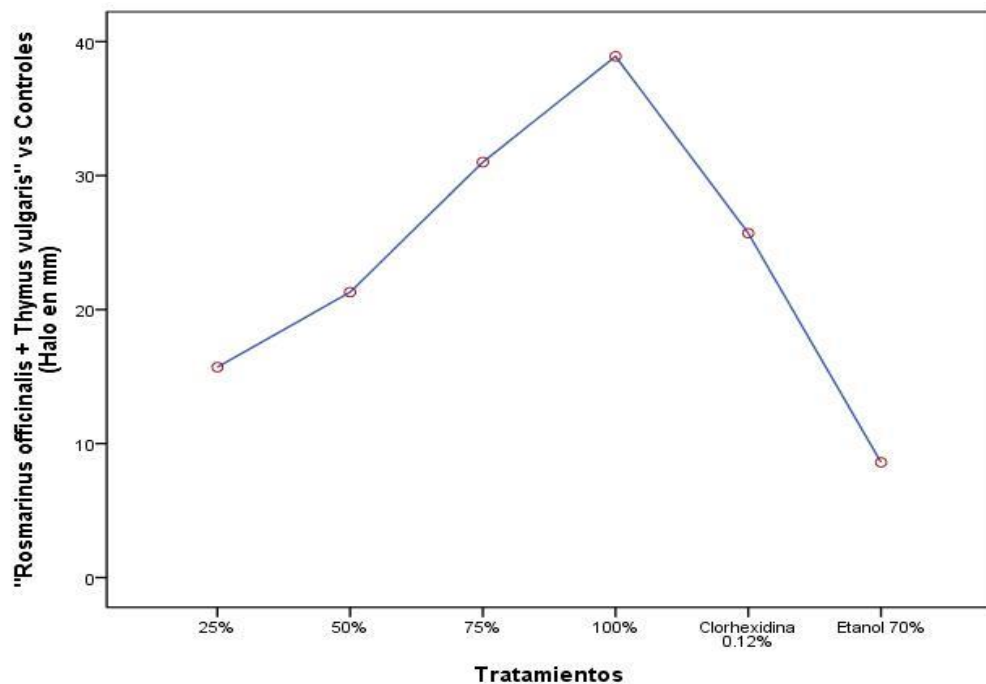


FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa los promedios del halo de inhibición de las concentraciones del extracto hidroetanólico de de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en todas las concentraciones. Al 25% 11,2mm, 50% 18,8 mm, 75% 23,8mm, 100% 30,6 mm. Los resultados obtenidos indican a mayor concentración mayor efecto antibacteriano.

Anexo 3

Grafico 3. Comparación del efecto antibacteriano de las cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



FUENTE: Datos proporcionados por el investigador

Se observa los promedios del halo de inhibición de las concentraciones de la preparación mixta del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y del extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se observa efecto antibacteriano en todas las concentraciones. Al 25% halo de 15,7 mm; 50% halo de 21,3 mm; 75% halo de 31 mm15,7; 100% halo de 38,9; grupo control negativo etanol al 70% con un halo de 8,6mm; grupo control positivo clorhexidina 0.12% con un halo de 25,7%. Los resultados obtenidos indican que a mayor concentración mayor efecto antibacteriano.

Anexo 4

CERTIFICADO DE PLANTA ORGANICA

**EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE LA PAPA Y CULTIVOS
ANDINOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**

Hace constar que:

Las plantas de *Rosmarinus officinalis* (L.) "Romero", que crecen dentro del área de investigación del Instituto, sito en el Campus de la Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Trujillo, son cultivadas de manera natural sin el uso de fertilizantes químicos, ni plaguicidas, catalogándose como un cultivo orgánico.

Trujillo, 15 de diciembre del 2017.



DIRECTOR DR. ELOY AGUIRRE MEDINA
DIRECTOR IPACA-UNT.

Anexo 5

CERTIFICADO DE PLANTA ORGANICA

**EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE LA PAPA Y CULTIVOS
ANDINOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**

Hace constar que:

Las plantas de *Thymus vulgaris* (L.) "Tomillo", que crecen dentro del área de investigación del Instituto, sito en el Campus de la Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Trujillo, son cultivadas de manera natural sin el uso de fertilizantes químicos, ni plaguicidas, catalogándose como un cultivo orgánico.

Trujillo, 15 de diciembre del 2017.


DIRECCIÓN
Dr. Eloy López Medina
DIRECTOR IPACA-UNT.

Anexo 6

CONSTANCIA DE LA QUÍMICO FARMACÉUTICA

CONSTANCIA

Yo, Marilú Roxana Soto Vásquez Docente investigador, doctora en farmacia y bioquímica, de la facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Mediante el presente dejo constancia de estar asesorando a la alumna Yvis Pamela Vigil contreras, en la parte de la elaboración de los extractos del proyecto de investigación titulado "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO A BASE DE *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175"

Trujillo 11 de octubre de 2017




Marilú Roxana Soto Vásquez

Docente investigador

De la facultad de farmacia y bioquímica

De la Universidad Nacional de Trujillo.

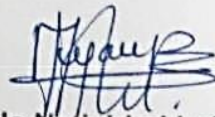
Anexo 7

CONSTANCIA DE LA MICROBIÓLOGA

CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de estar asesorando a la alumna Yvis Pamela Vigil Contreras, en la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO A BASE DE *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus* (Tomillo) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175".



Manuela Natividad Luján Velásquez

Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología
Universidad Nacional de Trujillo.

Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

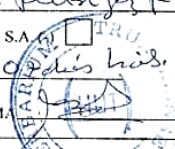
Anexo 8

RECIBO IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

DESGLASABLE
Apellidos y Nombres: VIGIL CONTRERAS JUIS PAHELA DNI 48675695
Objeto de la Solicitud: (Indicar en forma clara lo que solicita y detallar documentos que adjunta)
Determinación taxonomica de 2 plantas


Nº Procedimiento del TUPA: 142
Reuibo N°: 150-150-1
151-150-1
Código: 10 días háb.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD U OFICINA Herbario HUT
FECHA 09/11/2017 HORA: 9:45
RECEPCIONISTA: Eric F. Padrija R.
AUTOMATICO S.A. (+) S.A. (N) TRU
PLAZO ATENCIÓN (Según TUPA): 09 días háb.
REGISTRO _____ FIRMA: [Firma]



DISTRIBUCIÓN GRATUITA

Anexo 9

**Herbarium Truxillense (HUT)**
Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 89 – 2017- HUT

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

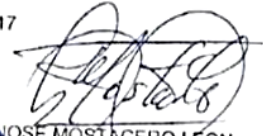
Da Constancia de la determinación taxonómica de un (02) especímenes vegetales:

Clase: Equisetopsida	Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae	Subclase: Magnoliidae .
Super Orden: Asteranae	Super Orden: Asteranae
Orden: Lamiales	Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae	Familia: Lamiaceae
Género: <i>Rosmarinus</i>	Género: <i>Thymus</i>
Especie: <i>R. officinalis</i> L.	Especie: <i>T. vulgaris</i> L.
Nombre vulgar: "romero"	Nombre vulgar: "tomillo"


Muestra alcanzada a este despacho por YVIS PAMELA VIGIL CONTRERAS, identificado con DNI N°48675695, con domicilio legal en Pasaje Arequipa # 624 Urb. Palermo - Trujillo; estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis para optar Título de Cirujano Dentista: "Evaluación del efecto antibacteriano de la combinación del extracto etanólico a base de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Thymus vulgaris* "tomillo" sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175".

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

Trujillo, 11 de Octubre del 2017


JOSE MOSTACERO LEON
Director del Herbario HUT

cc. Herbario HUT



E- mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com

Anexo 12

Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk

Romero (Halos en mm)	Estadístico	gl	p
25%	0.8660	10	0.0898
50%	0.8582	10	0.0727
75%	0.8303	10	0.0516
100%	0.8370	10	0.0578

Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk

Thymus vulgaris "Tomillo" (Halos en mm)	Estadístico	gl	p
25%	0.8621	10	0.0781
50%	0.8322	10	0.0566
75%	0.8469	10	0.0596
100%	0.8933	10	0.1847

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Romero y Tomillo	Estadístico	gl	p
25%	0.8721	10	0.1057
50%	0.8562	10	0.0688
75%	0.8733	10	0.1091
100%	0.8489	10	0.0674
Clorhexidina 0.12%	0.8371	10	0.0579
Etanol 70%	0.8159	10	0.0527

Anexo 13

Para medir los halos de inhibición de cada tratamiento se utilizó una regla Mitutoyo digital Vernier caliper 0-150 mm / 0.01 mm métrico/pulgada Calibre 196.500-30 con ISO de calidad 17025.



Anexo 14

Rosmarinus officinalis (Romero) y *Thymus* (Tomillo)



Las plantas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris*(Tomillo) fueron cultivadas en el biohuerto de Trujillo

Anexo 15

RECOLECCIÓN



Se recolecto 1 Kg de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) se realizó en el biohuerto de la facultad de educación de la Universidad Nacional de Trujillo



Se recolecto 1 kg de las hojas de *Thymus vulgaris* (Tomillo) se realizó en el biohuerto de la Universidad Nacional de Trujillo

Anexo 16

➤ LAVADO



Luego se procederá a lavar cada una de las hojas con agua destilada y luego se desinfectarán con hipoclorito de sodio



Anexo 17

➤ DESINFECCIÓN



Luego se procederá a lavar cada una de las hojas con agua destilada



Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5%. Aplicando una gotas

Anexo 18



Se procedió a desinfectar cada una de las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Thymus vulgaris* (Tomillo)



Anexo 19

➤ SECADO

Las hojas de ambas muestras vegetales fueron colocadas en papeles Kraft, y se llevaron a secar a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 C) por 48 horas



Las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo) fueron colocadas en papeles Kraft para el secado



Anexo 20

➤ SECADO:

Las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo) Se llevaron a secar a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 C) por 48 horas



Anexo 21



Las hojas de las plantas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo) después de 48 horas de haber estado en la estufa de circulación de aire por convección forzada (40 C)

Anexo 22



Después de 48 horas de haber estado en la estufa de circulación de aire por convección forzada (40 C), Se separó las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo) de los tallos

Anexo 23

➤ PULVERIZACIÓN



Luego de pulverizar con el mortero las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo)son pulverizadas con el molino

Anexo 24

➤ TAMIZAJE



Las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo) son pulverizadas y tamizadas a través del tamiz de malla N° 20



Anexo 25

ALMACENAMIENTO: El polvo de las hojas de ambas muestras vegetales será guardado en sus respectivos frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha.



Utilizamos 100 gramos cada vegetal para los extractos etanolitos



Vaciando el *Rosmarinus Officinalis* (Romero) pulverizado.



Medimos en el alcoholímetro el porcentaje del alcohol al 70%



Agregamos el alcohol al 70% para el macerado

Anexo 26

Moviendo para que la mezcla sea homogénea de las hojas de romero y Thymus (Tomillo)



Moviendo para que la mezcla sea homogénea de las hojas *Rosmarinus officinalis* (Romero) *Thymus vulgaris* (Tomillo)



Macerado después de 7 días

Anexo 27

Preparación de las concentraciones del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y extracto hidroetanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).



Anexo 28

PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO

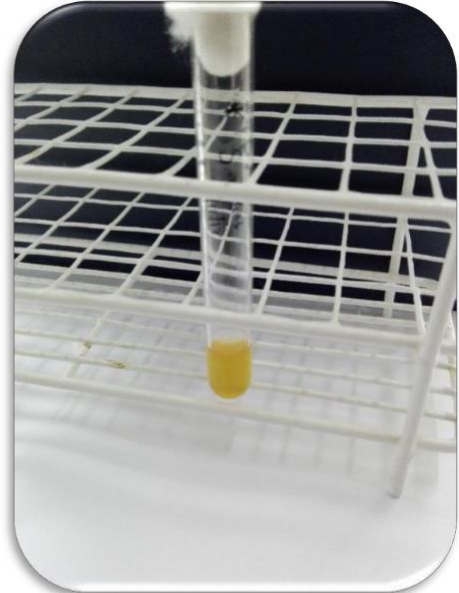


Observación de la bacteria *S. mutans* ATCC 25175

➤ EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO MEDIANTE EL MÉTODO DE KIRBY BAUER



S. mutans ATCC 25175 en agar Muller Hinton



S. mutans ATCC 25175 en caldo BHI

Anexo 29

Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175



La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mantenida en Caldo Brain Heart Infusión (BH) I se sembrará en Agar TSA, se incubará bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas

Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175



Se diluye en caldo Brain Heart Infusion (BHI) o solución salina fisiológica estéril hasta obtener una turbidez

Anexo 30

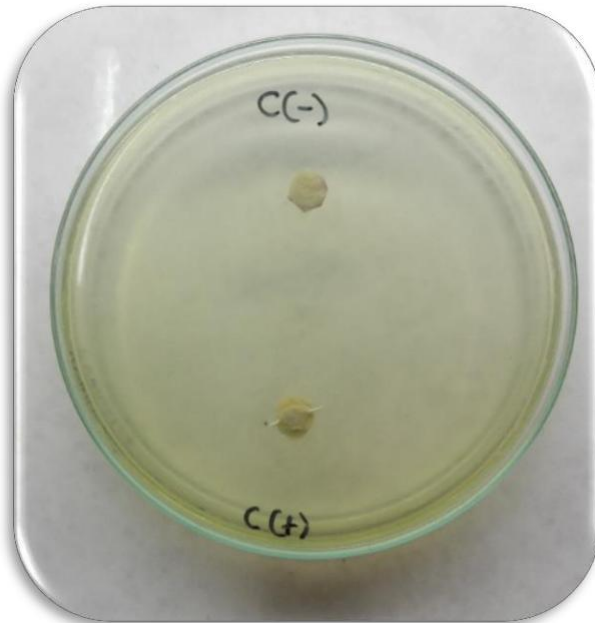
Inoculación de las placas

Se toma una alícuota de 100 ul y se coloca en cada una de las placas con Agar Müller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuirá la suspensión para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa

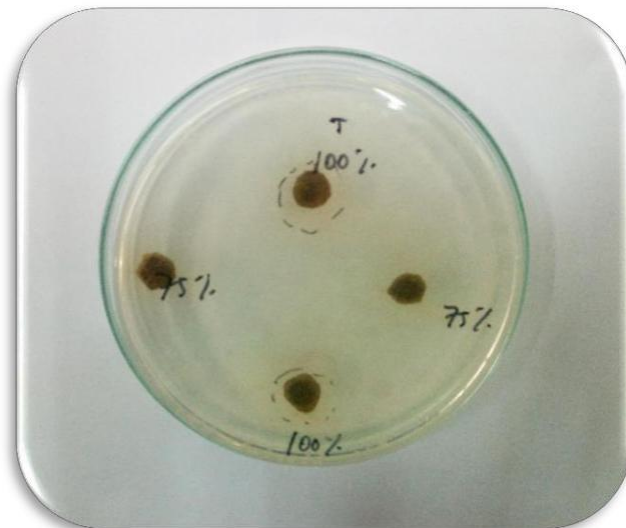


Anexo 31
LECTURA DE LOS RESULTADOS

Control positivo

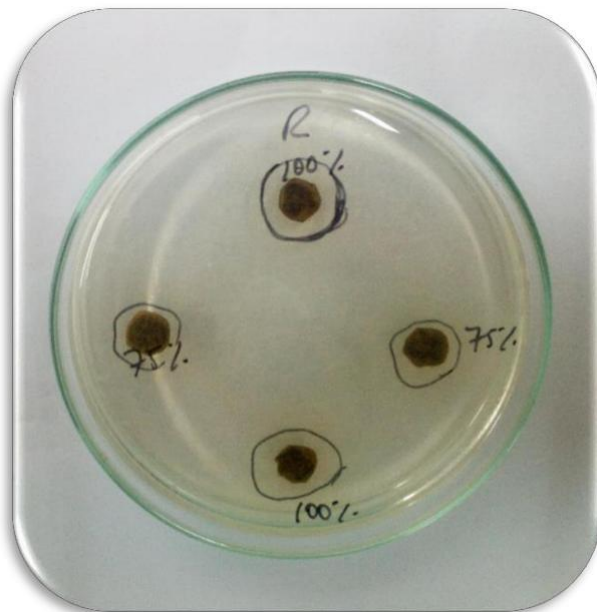


***Thymus vulgaris* (tomillo).**



Anexo 32

Rosmarinus officinalis (romero)



Rosmarinus officinalis (ROMERO) Y *Thymus vulgaris* (TOMILLO)

