



Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* "romero"

Inhibition of *Streptococcus mutans* with aqueous extract and rosmarinus officinalis "rosemary" "romero"

Inibição de Streptococcus mutans, utilizando extratos aquoso e oleoso de Rosmarinus officinalis "alecrim"

Ximena Katherine Solano Solano¹, Tamara Jacqueline Moya Silva²,
María Isabel Zambrano Gutiérrez³

RECIBIDO Marzo/ 2016 **CORREGIDO** Noviembre/ 2016 **APROBADO** Diciembre/ 2016

- 1 Odontóloga, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador; solano.xime@gmail.com
- 2 Especialista en atención primaria de la salud, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, tjmoya@uce.edu.ec
- 2 Magister en gerencia y auditoría de servicios de salud bucal, Diplomado superior en odontología estética, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador; izambrano@uce.edu.ec

RESUMEN

Objetivo: Determinar la inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos: acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero), aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco. **Materiales y métodos:** El presente estudio experimental evaluó la acción antimicrobiana de *S. mutans* ATCC 25175 a través de técnica de difusión de discos en medio sólido. Se utilizó dos grupos de 15 muestras cada una en cajas Petri; siendo G1: Extracto acuoso de 1.5% y 3%, G2: Extracto oleoso 50%. Cada uno de los grupos tuvo un control positivo de Clorhexidina 0.12% y un control negativo de agua destilada. Se aplicó el test estadístico de U Mann Whitney con un nivel de significancia de 5%. **Resultados:** Los extractos acuosos y el agua destilada produjeron un halo de inhibición de 0 mm. El extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93 mm de halo de inhibición ($p < 0.001$), versus la Clorhexidina que presentó una media de 16.13 mm ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias entre el extracto oleoso y la clorhexidina ($p > 0.05$). **Conclusiones:** El extracto acuoso de romero no mostró efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*. El extracto oleoso de romero mostró acción antibacteriana sobre *S. mutans*, siendo similar a la clorhexidina.

Palabras Claves: Odontología pediátrica; microbiología; fitoterapia.

ABSTRACT

Objective: Determine the inhibition of bacterial growth in vitro of *Streptococcus mutans*, using aqueous and oily *Rosmarinus officinalis* (rosemary) extracts with microbiological disk diffusion technique. **Materials and methods:** This study evaluated the antimicrobial action of *S. mutans* ATCC 25175 with a disk diffusion technique in a solid environment. Two groups of 15 samples each in Petri dishes consisted in: G1: 1.5% and 3% aqueous extract; G2: 50% oily extract. Each of the groups had Chlorhexidine 0.12% positive control and a distilled water negative control. The U Mann Whitney statistical test was applied with a 5% significance level. **Results:** Aqueous extracts and distilled water produced an inhibition halo of 0 mm. The oily extract produced an average of 11.93 mm inhibition halo ($p < 0.001$), versus Chlorhexidine with a 16.13 mm ($p < 0.001$) average inhibition halo. No differences were found between the oily extract and chlorhexidine ($p < 0.05$). **Conclusions:** Aqueous extract of rosemary has no antibacterial effect on *S. mutans*. Oily rosemary extract has antibacterial action on *S. mutans* similar to chlorhexidine.

Keywords: Pediatric dentistry; microbiology; phytotherapy.

RESUMO

Objetivo: Determinar a inibição do crescimento bacteriano in-vitro de *Streptococcus mutans*, utilizando extratos: aquoso e oleoso de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), aplicando o teste de disco-difusão. **Materiais e Métodos:** O presente estudo experimental avaliou a ação antimicrobiana de *S. mutans* ATCC 25175 através do teste de disco-difusão num meio de cultura sólido. Utilizaram-se dois grupos de 15 amostras cada um, colocados em placas de petri; sendo G1: Extrato aquoso de 1,5% e 3%, G2: extrato oleoso 50%. Cada um dos grupos teve um controle positivo de clorexidina 0,12% e um controle negativo de água destilada. O teste de U Mann Whitney com nível de significância de 5% foi aplicado. **Resultados:** OS extratos aquosos e água destilada produziram um halo de inibição de 0mm. O extrato oleoso teve uma média de 11,93mm de halo de inibição ($p < 0,001$) comparado com a clorexidina que apresentou uma média de 16,13mm ($p < 0,001$). Não se encontraram diferenças significativas entre o extrato oleoso e a clorexidina ($p > 0,05$). **Conclusões:** O extrato aquoso de alecrim não apresentou nenhum efeito antibacteriano sobre o *S. mutans*. O extrato oleoso de alecrim apresentou ação antibacteriano sobre *S. mutans*, sendo similar à clorexidina.

Palavras chave: Odontologia pediátrica, microbiologia, fitoterapia.

INTRODUCCIÓN

La importancia en el área médica y odontológica de productos naturales se hacen fundamental hoy en día. La elaboración de ensayos microbiológicos que comprueba la actividad antimicrobiana de extractos naturales, sin utilizar soluciones extractoras de alcohol, para la inhibición de *Streptococcus mutans*¹ contribuyen como una medida coadyuvante a la prevención de futuras enfermedades como caries en niños^{2,3}.

En el Ecuador, los fitofármacos elaborados con base de especies vegetales como *Rosmarinus officinalis* “Romero” están tomando mayor importancia, pero con aplicación en áreas ajenas a Odontología y Odontopediatría^{4,5}.

Se conoce poco sobre las genuinas propiedades antimicrobianas que tienen *Rosmarinus officinalis* “romero” frente al *S. mutans*, principalmente porque la mayoría de ensayos microbiológicos los realizan con soluciones extractoras de alcohol o etanol^{6,7,8}, que puede influir en el resultado de su evaluación antimicrobiana⁹ y en su posible aplicación en Odontopediatría.

En Ecuador, no existen estudios que utilicen antimicrobianos naturales con uso potencial en Odontología, menos aún en Odontopediatría; por lo tanto la relevancia de esta investigación radica en que para obtener la validación inhibitoria de *Rosmarinus officinalis* (Romero) frente al *Streptococcus mutans* se han elaborado extractos que no involucran como solución extractora alcohol u otra sustancia puedan interferir con la verdadera actividad antimicrobiana de esta especie vegetal, con este propósito esta investigación tiene por objeto manejar soluciones acuosas y oleoso de *Rosmarinus officinalis*, aplicando la técnica microbiológica de difusión disco.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio experimental contó con la aprobación del Comité de investigación de la Facultad de Odontología de Universidad Central del Ecuador. Dado su alcance microbiológico *In vitro* se tomó en cuenta como población la cepa

estandarizada a ensayarse: *Streptococcus mutans* ATCC25175 que se obtuvo por parte de MEDIBANC INC S.A. importadora de insumos para laboratorios clínicos y la especie vegetal romero taxonómicamente certificada por el Centro de Biología-Dirección General de Investigación de la Universidad Central del Ecuador.

Elaboración y caracterización del extracto utilizado.

Previamente realizada la identificación botánica de la especie *Rosmarinus officinalis*, se elaboraron los extractos: acuoso y oleoso (aceite esencial) de las hojas de romero en el instituto OSP (Oferta, servicios y productos) de la Facultad de Ciencia Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

Para la obtención del extracto acuoso, las hojas de romero se lavaron, desinfectaron y se expusieron a un proceso de secado natural por 24 horas. Luego se pesó 100 gramos de materia prima y se secó por tres horas a temperatura de 60 ° C en una estufa; Se maceró con agua destilada por tres días con agitación continua temperatura ambiente; posterior a ello se filtró el extracto con papel filtro de 50 micrómetros. Se evaporó el agua por 18 horas a 70 ° C; se envasó el extracto acuoso en un recipiente de vidrio ámbar y se irradió con luz ultravioleta por 15 minutos para eliminación de microorganismos contaminantes, posteriormente, se realizó una prueba microbiológica para corroborar su esterilidad.

El extracto oleoso se obtuvo por destilación de arrastre de vapor, realizando el mismo tratamiento preliminar del vegetal que en el acuoso, con 2 kilogramos de romero se utilizó como solución extractora n-hexano, solvente volátil que fue evaporado por destilación simple a 50 ° C. En la destilación por arrastre de vapor las hojas se secaron por tres horas a temperatura de 60 ° C en una estufa común, por 4 horas en tres repeticiones, hasta obtener una cantidad que supere los 5 ml. Luego se filtró el aceite obtenido, en papel filtro de tamaño de poro de 50 micrómetros. Se envasó el aceite en un tubo de ensayo sellado; se irradió de la misma manera que el acuoso y se comprobó su pureza con una prueba en blanco (prueba microbiológica).

Determinación de las concentraciones de los extractos.

Para determinar las concentraciones del extracto acuoso se utilizó el método de recuento de sólidos totales y se obtuvo dos concentraciones de extracto acuoso de romero al 1.5 % y al 3%.

Para establecer la concentración de extracto oleoso (aceite esencial) se realizó el método de dilución en caldo para obtener la Concentración Mínima Bactericida (CMB)¹⁰, en el que a partir de 2ml de aceite esencial de romero, se distribuyó en nueve tubos de ensayo previamente rotulados; 1 ml de extracto oleoso en el tubo 1 para luego transferir 1 ml del tubo 1 al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo nueve, así también 50 ml de TSB (Trypticase Soya Broth) y *S. mutans* a 0,5 de escala Mac Farland. Los tubos se incubaron a 37 ° C por 48 h y se determinó la CMB.

Evaluación de la actividad bacteriana de los extractos preparados con la técnica de difusión en disco.

Una vez conocidas las concentraciones para cada extracto, se preparó inóculos bacterianos de *S. mutans* a una escala de 0,5 Mac Farland (*Figura N° 1 a y b*) y se sembró en cajas mono Petri con agar Mueller hinton y sangre de cordero al 2 %. Se rotuló las placas indicando el número de ensayo y la posición de los discos, así como también los controles positivo y negativo.

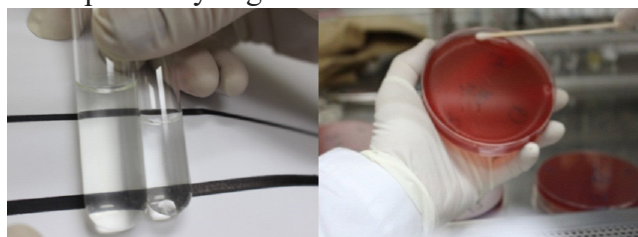


Figura N° 1. Preparación del inóculo bacteriano; Siembra de *S. mutans*.

Con pinzas estériles, se colocó discos de papel filtros impregnados con 20 uL de las soluciones a investigar (*Figura N° 2*) con una pipeta automática, colocando en los sitios ya rotulados.



Figura N° 2. Aplicación de extractos en discos

A continuación las placas se incubaron a 37 ° C por 48 h, en una jarra de anaerobiosis GasPak y en una incubadora (GCA, modelo 6). Transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición con la regla microbiológica (calibrador Microbial Sensitivity data) (*Figura N° 3*).

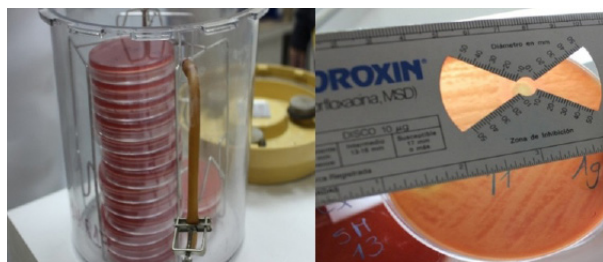


Figura N° 3. Jarra de GasPak; Medición de halos de inhibición.

Los datos obtenidos de recuentos de UFC en el análisis microbiológico fueron plasmados en una tabla de Microsoft Excel 2010, permitiéndonos ingresar estos datos al programa SPSS versión 22. Se realizó el test de U Mann Whitney con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS

En el cuadro N° 1 se muestra la media de los resultados obtenidos de halos de inhibición para *Streptococcus mutans*, medidos sin incluir el diámetro de los discos de papel filtro (6mm). El cuadro N° 2 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 ($p < 0.001$).

El extracto oleoso no muestra diferencia con la Clorhexidina en la inhibición de *S. mutans*.

Concentración de la sustancia						
		E. Acuoso 1,5%	E. Acuoso 3%	E. Oleoso 50%	Clorhexidina 0,12%	Agua destilada mm
Halo de Inhibición	Media	0	0	11,93	16,13	0
	Desv. Estan.	0	0	1,38	1,24	0
	Mínimo	0	0	14,00	18,00	0
	Máximo	0	0	10,00	15,00	0

Cuadro N° 1. Actividad inhibitoria de los extractos elaborados de romero de los diferentes grupos frente a *Streptococcus mutans*.

Soluciones empleadas		P
Extracto acuoso 1,5%	Extracto oleoso al 50%	<0,001
Extracto acuoso 3%		
Agua destilada		
Extracto acuoso 1,5%	Clorhexidina al 0,12%	<0,001-
Extracto acuoso 3%		
Agua destilada		
Extracto oleoso al 50%	Clorhexidina al 0,12%	>0,05

Cuadro N° 2.- Test de U Mann Whitney para las diferentes soluciones empleadas

DISCUSIÓN

La importancia de este estudio radica en la búsqueda de antimicrobianos de uso en Odontología a partir de extractos de plantas conocido como fitoterapia, esto va tomando mayor fuerza debido a las bondades medicinales de estas plantas. El *Rosmarinus Officinalis* (romero) por sus principios activos, en especial los terpenoides encontrados en el aceite esencial de sus hojas poseen actividad antimicrobiana^{11,12}. Por lo cual fue considerado en el presente estudio.

Araújo-Silva, et al, 2008⁶; manifiesta en su investigación que se ha confirmado que extracto eta-

nólico *Rosmarinus officinalis* posee amplia actividad antimicrobiana frente a un sin número de bacterias orales. En países como Perú y Brasil, especialmente en el primero se han realizado varias investigaciones para demostrar la acción antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* con ensayos dirigidos hacia la práctica Odontológica⁸. Purca, 2013¹³, realizó evaluaciones in vitro para determinar la actividad antibacteriana de un extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis* en tres concentraciones para microorganismos frecuentes en la flora salival de pacientes infantiles, concluyendo que el romero tenía mayor acción antimicrobiana cuanto mayor era su concentra-

ción, datos que no concuerdan con los resultados obtenidos dentro de esta investigación ya que el extracto oleoso del *Rosmarinus officinalis* al 50% tuvo una actividad microbiana frente al extracto acuoso que en concentraciones menores no mostró ningún efecto.

CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de romero no mostro efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*.
- El extracto oleoso de romero mostró acción antibacteriana sobre *S. mutans*, siendo similar a la clorhexidina.

AGRADECIMIENTOS

Al Ph.D. Gustavo Tello, por su contribución significativa en el proceso de corrección del presente manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rates S. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001 may; 39(5): 603-613.
2. Elisabetsky E. Etnofarmacología. *Ciência e Cultura*. 2003 sep; 55(3): 35-36.
3. Negroni M. *Microbiología Estomatológica: fundamentos y gupia práctica*. 3rd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
4. Estrada-Orozco S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). Tesis de grago previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba: Escuela Superiro Politécnica de Chimborazo, Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2010.
5. Mosquera-Tayupanta T. Estudio comparativo de la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite de romero (*Rosmarinus officinalis* Lamiales) utilizados como conservantes en luna formulación cosmética. Tesis previa la obtencion del Titulo de Magister en Ciencias y Tecnologías Cosméticas. Quito: Universidad Politecnica Salesiana, Maestría en Ciencias Tecnológicas y Comesticas ; 2014.
6. Araújo-Silva M, Silva M, Higinio J, Vieira-Pereira M, Carvalho A. Actividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais plactonicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008 jun; 18(2): 236-240.
7. Pinheiro-Abreu M, Brindeiro D, Dantas de Almeida L, Cavalcanti Y, Nascimento W. Efeito Antimicrobiano de Tinturas de Produtos Naturais sobre Bactérias da Cárie Dentaria. *Rev Bras Promoç Saúde*. 2012 jun; 25(2): 197-201.
8. Purca Peña TP. Efectividad antibacteriana “in vitro” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival. Lima; 2013.
9. Ramos-Clemente A. Actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Porphyromonas Gingivalis*, estudio in vitro. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
10. Mosquera T, Veloz T. Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam.)Kostern.ex O.C.Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& L.M.Perry. *La Granja*. 2011 may; 13(1): 31-41.
11. Illera G. Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus Officinalis*). Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, Química-Física Aplicada; 2012.
12. Avila-Sosa R, Navarro-Cruz A, Vera-López O, Dávila-Márquez R, Melgoza-Palma N, Meza-Pluma R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.):una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*. 2011; 15(43): 23-36.
13. Purca T. Efectividad antibacteriana “in vitro” del extracto etanolico del *Rosmarinus officinales* (Romero) sobre flora salival. Tesis para obtener el Título de Cirujano Dentista. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2013.