

EFFECTO INHIBITORIO IN VITRO DE *Rosmarinus Officinalis* SOBRE *Streptococcus mutans*

INHIBITORY EFFECT IN VITRO OF
Rosmarinus Officinalis ON
Streptococcus mutans

*Irsa Liz Mostacero Saucedo*¹
*Olinda del Pilar Bustamante Canelo*²
*Liz Carmy Mostacero Saucedo*¹
*Leydi Judith Carranza Santacruz*¹
*Miguel Ángel Ruiz Barrueto*³

Fecha de recepción: 18 marzo 2013

Fecha de aceptación: 28 junio 2013

Resumen

En la presente investigación se determinó el efecto inhibitorio de la infusión del *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans*, con el fin de controlar procesos cariogénicos y formación de placa bacteriana en la cavidad

-
- (1) Adscripto en el pregrado de la Escuela de Estomatología, estudiante, Universidad Señor de Sipán, Chiclayo, Perú, irl_2307@hotmail.com
(2) Adscripto en la Escuela de Estomatología, Magíster en Ciencias Mención en Ingeniería Ambiental, Universidad Señor de Sipán, Chiclayo, Perú, olyphibuca@hotmail.com
(3) Adscripto al laboratorio de Microbiología y Parasitología, Biólogo Microbiólogo, Universidad Señor de Sipán, Chiclayo, Perú, Mblgo.miguel.ruiz@hotmail.com

oral. La infusión de *Rosmarinus officinalis* tiene propiedades terapéuticas dependiendo de la concentración utilizada. Para ello, se enfrentó la suspensión bacteriana de 3×10^7 UFC/ml a 3 concentraciones de infusión de romero: 0%, 20% y 40 % durante 1 y 5 minutos respectivamente, realizado in vitro en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Estomatología; se empleó el método de siembra en superficie para contabilizar las UFC/ml sobrevivientes al efecto inhibitorio. La evaluación se basó en la comparación de los recuentos obtenidos en los ensayos problema con el control, efectuándose tres repeticiones para cada ensayo. Los recuentos obtenidos en cada repetición se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) y análisis de diferencia significativa (Games-Howerd). Como resultado se obtuvo que para el *S. mutans*, la infusión de *R. officinalis* al 40% presentó mayor eficacia con una media de 20530000,00 y una diferencia significativa de 0.0028 a los dos tiempos de exposición (1 y 5 minutos); mientras que al 20% se obtuvo una media de 2016666,67 y tanto a 1 minuto como a los 5 minutos mostró una diferencia significativa de 0,0002 respecto al ensayo control. Concluyendo que a mayor concentración y tiempo de exposición de la infusión de *R. officinalis*, mayor es el efecto inhibitorio sobre *S. mutans*.

Palabras claves: Efecto inhibitorio, *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*.

Abstract

In the present investigation was determined the inhibitory effect of the infusion of *Rosmarinus officinalis* on *Streptococcus mutans*, in order to control cariogenic processes and formation of bacterial plaque in the oral cavity. The infusion of *Rosmarinus officinalis* has therapeutic properties depending on the concentration used. For it, was faced the bacterial suspension of 3×10^7 UFC/ml to 3 concentrations of infusion of rosemary: 0 %, 20 % and 40 % during 1 and 5 minutes respectively; realized in vitro in the laboratory of Microbiology of Estomatología, was used the method of sowing in surface to assess the surviving of UFC/ml to the inhibitory effect. The evaluation was based on comparing the counts obtained in the tests problem with control, being realized three replicates for each test. Those counts obtained in every repetition were analyzed statistically by the analysis of variance (ANOVA) and differentiates significant analysis (Games-Howerd). As result were obtained for the *S. mutans*, that *R. officinalis* infusion to 40% showed greater efficiency with a mean of 20530000.00 and a significant difference of 0.0028 at two exposure times (1 and 5 minutes), while 20% was obtained a half of 2016666.67 and both 1 as the 5 minutes showed a significant difference test of 0.0002 with respect to control. Concluding that at higher concentration and exposure time of the

infusion of *R. officinalis*, major it is the inhibitory effect on *S. mutans*.

Key Word: Inhibitory effect, *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus mutans*.

1. Introducción

La caries dental, es una enfermedad infectocontagiosa y transmisible, que produce desintegración progresiva de sus tejidos calcificados, debido a la acción de los microorganismos sobre carbohidratos fermentables. Se caracteriza por la desmineralización de la porción mineral y la disgregación de la parte orgánica. Se puede mencionar diversas causas debido a su naturaleza multifactorial, sin embargo, aún nos queda mucho por aprender sobre el inicio, la formación y la prevención de la caries dental. Los *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y los *Lactobacillus* son las bacterias fundamentales en el inicio y progresión de la caries dental y otras enfermedades bucodentales (Silverstone, 1981).

No obstante se pueden escoger diferentes patrones preventivos de caries que pueden aplicarse de manera individual, entre ellos se puede mencionar modificación de la dieta, utilización de fluoruros, selladores de fosas y fisuras, supresión de la placa dental, antimicrobianos y una correcta instrucción de higiene oral. Phyllis (2000) dice que uno de los medios para enfrentarla en los tiempos modernos, es el uso de sustancias naturales, especialmente aquellas que contienen polifenoles, sea: 1) como infusión, 2) luego de un tiempo de hervido, o 3) como extracto luego de un proceso químico.

Sin embargo en la elaboración de fármacos y enjuagues bucales en la actualidad se emplean varios compuestos químicos sintéticos como antioxidantes y agentes antimicrobianos. Algunas de esos compuestos son el Butilhidroxitolueno (BHT) y el hidroxianisol (BHA). El inconveniente, es que si bien la adición de compuestos sintéticos está restringida y reglamentada, se ha comprobado que pueden ser tóxicos, cancerígenos o cirróticos y generar, en consecuencia, efectos perjudiciales en la salud, desde fines de la década del 90, en distintas partes del mundo se ha registrado un renovado interés en desarrollar líneas de investigación orientadas a la búsqueda de compuestos bioactivos naturales, extraídos de plantas, que puedan reemplazar a los sintéticos (Moreno, 2009).

En la presente investigación se plantea como problema saber ¿Cuál es el efecto inhibitorio de la infusión de *Rosmarinus officinalis* "Romero", sobre *Streptococcus mutans* IN VITRO?.

En tal sentido, se recaba información actual acerca de la actividad antimicrobiana de sustancias naturales sobre microorganismos que afectan la cavidad bucal, sustancias que pueden inhibir el crecimiento de las bacterias como *S. mutans*, a través de la infusión de Romero (*Rosmarinus officinalis*), herbácea que cuenta con propiedades curativas (planta medicinal), dando así la obtención de un producto para prevenir y/o dar tratamiento a cualquier enfermedad relacionada con la cavidad bucal, a largo plazo pueda ser utilizado por la industria farmacéutica como una solución antibacterial, mediante un enjuague bucal.

Es por ello que el objetivo general del presente trabajo fue: Determinar el efecto inhibitorio IN VITRO de la infusión de *Rosmarinus officinales* "Romero", sobre *Streptococcus mutans*; teniendo como objetivos específicos: a) Evaluar el efecto inhibitorio IN VITRO de la infusión de *Rosmarinus officinales* "Romero", sobre *Streptococcus mutans* al 20% por 1 y 5 minutos. b) Evaluar el efecto inhibitorio IN VITRO de la infusión de *Rosmarinus officinales* "Romero", sobre *Streptococcus mutans* al 40% por 1 y 5 minutos.

Por su parte la odontología actual proporciona la rehabilitación oral ante presencia de enfermedades bucales, pero no está al alcance de la mayoría de pobladores Lambayecanos, debido a los bajos recursos económicos con los que ellos disponen, por lo que el propósito de la presente investigación es dar una terapia alternativa con el uso de sustancias naturales como el Romero, ya que forma parte de la biodiversidad del departamento de Lambayeque, de fácil adquisición y cuyas propiedades antimicrobianas han sido demostradas en varias investigaciones.

2. Material y métodos

Para la presente investigación se utilizó material biológico: infusión de *Rosmarinus officinalis* y cepa de *Streptococcus mutans* aisladas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Así mismo se utilizó material y equipos de laboratorio de Microbiología de la Escuela de Estomatología de la Universidad Señor de Sipán.

La preparación y estandarización del inóculo se realizó siguiendo el método descrito por Al – Delaimy, o técnica turbidimétrica, con la cual se determinó la concentración inicial de la bacteria, en el tubo numero 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} . Otro paso importante fue la obtención de infusión de *Rosmarinus officinalis* por medio de ebullición, a partir del cual se obtuvieron concentraciones de infusión de 20 y 40%.

Posteriormente, cuando ya se obtuvo el inóculo y la infusión de *R. officinalis* se procedió a efectuar el ensayo en el cual la suspensión bacteriana de *S. mutans* se sometió a exposición en la infusión de *R. officinalis* en las tres concentraciones evaluadas a uno y cinco minutos de exposición para cada ensayo respectivamente. Luego de la exposición de *S. mutans* a la infusión de *R. officinalis* se procedió a sembrar 0.1 mL de la suspensión bacteriana en placas con agar Müeller Hinton en condiciones de esterilidad, se realizó una extensión de la alícuota sobre la superficie del agar utilizando espátula de Drigalsky (utilizándose una espátula distinta por cada placa), luego se dejó secar la superficie del agar por 15 minutos y posteriormente las placas fueron invertidas y apiladas e incubadas a 37 °C durante 48 horas, pasadas las cuales se realizó el recuento de UFC de *S. mutans*. Los recuentos obtenidos fueron ordenados en cuadros y se le aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de significancia (Games-Howerd) para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos.

3. Resultados

En la tabla 1 se observa que a menor concentración de *R. officinalis* (20%) y tiempo de exposición (1 minuto) se alcanzó un promedio de $2,73 \times 10^7$ UFC/ml y a mayor concentración y tiempo de exposición (40% por 5 minutos), se alcanzó un promedio de $1,34 \times 10^6$ UFC/ml. Teniendo en cuenta que la concentración inicial de UFC/ml de *S. mutans* fue de 2.89×10^7 UFC/ml (Figura 1 y Figura 2).

Tabla 1:

Concentración de Streptococcus mutans (UFC/ml) en el efecto inhibitorio de la infusión de Rosmarinus officinalis a diferentes concentraciones y tiempos.

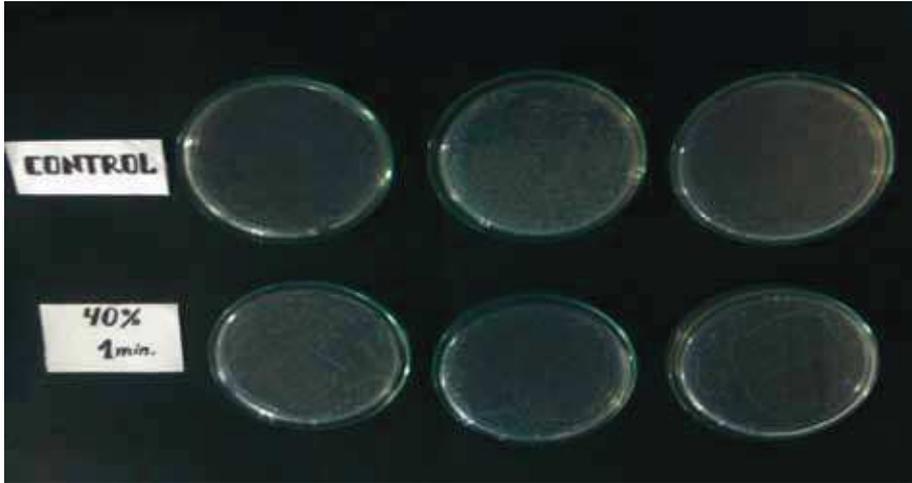
	CONC. %	R1	R2	R3	X
1'	0	$2,82 \times 10^7$	$2,95 \times 10^7$	$2,89 \times 10^7$	2.89×10^7
	20	$2,74 \times 10^7$	$2,72 \times 10^7$	$2,73 \times 10^7$	$2,73 \times 10^7$
	40	$1,52 \times 10^6$	$1,55 \times 10^6$	$1,53 \times 10^6$	$1,53 \times 10^6$
5'	0	$2,82 \times 10^7$	$2,95 \times 10^7$	$2,89 \times 10^7$	2.89×10^7
	20	$2,64 \times 10^7$	$2,65 \times 10^7$	$2,63 \times 10^7$	$2,63 \times 10^7$
	40	$1,32 \times 10^6$	$1,34 \times 10^6$	$1,36 \times 10^6$	$1,34 \times 10^6$

Nota: R1= Repeticiones, CONC= Concentración, Min = Minutos, X = Promedio

Fuente: Elaboración propia.

Figura 1:

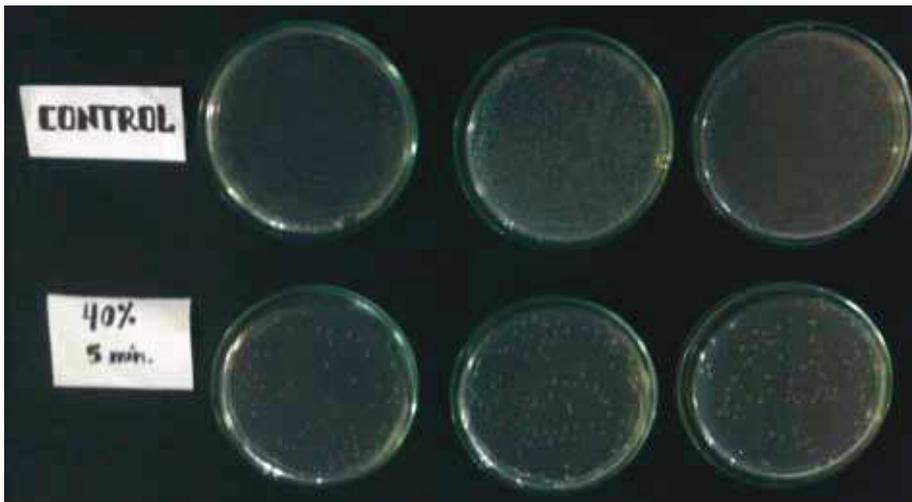
Efecto inhibitorio de Rosmarinus officinalis sobre Streptococcus mutans a una concentración de 40% durante 1 minuto frente al grupo control.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2:

Efecto inhibitorio de Rosmarinus officinalis sobre Streptococcus mutans a una concentración de 40% durante 5 minutos frente al grupo control.



Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 2 se aprecia la dispersión que hay uno sobre otro factor. El promedio total en concentraciones, tanto en el minuto 1 como en el minuto 5, son bastante diferentes.

En cuanto a la concentración donde no se aplicó ningún factor (controles), el promedio en ambos tiempos son iguales (de 28866666.67) y de igual manera en la desviación típica (con 650640.71). Al comparar ambas concentraciones porcentuales (tanto en 20% como 40%) de infusión de Romero en dos tiempos diferentes para ver el efecto inhibitorio en cantidades de UFC/ml, se puede observar un cambio, En la concentración de 20%, el promedio es ligeramente mayor en el minuto 1 que en minuto 5 (27300000 > 26400000), pero se observa una igual dispersión de los datos con respecto a sus promedios por tiempo.

Para la concentración de 40%, los promedios de las concentraciones comparado con los tiempos son bastantes diferentes, ya que en el minuto 1 las UFC/ml es mucho mayor que en el minuto 5 (1533333.33 > 1340000) y por lo tanto influye en la dispersión de los datos.

Tabla 2

Dispersión de los promedios de las UFC/ml de S. mutans en el efecto inhibitorio de la infusión de Rosmarinus officinalis a diferentes concentraciones y tiempos.

Concentración en	Tiempo en minutos	Media	Desv. Típ.	N
0%	1 minuto	28866666,67	650640,710	3
	5 minutos	28866666,67	650640,710	3
	Total	28866666,67	581950,742	6
20%	1 minuto	27300000,00	100000,000	3
	5 minutos	26400000,00	100000,000	3
	Total	26850000,00	500999,002	6
40%	1 minuto	15333333,33	152752,523	3
	5 minutos	1340000,00	20000,000	3
	Total	8336666,67	7665083,605	6
Total	1 minuto	23833333,33	6419890,965	9
	5 minutos	18868888,89	13194093,80	9
	Total	21351111,11	10384656,61	18

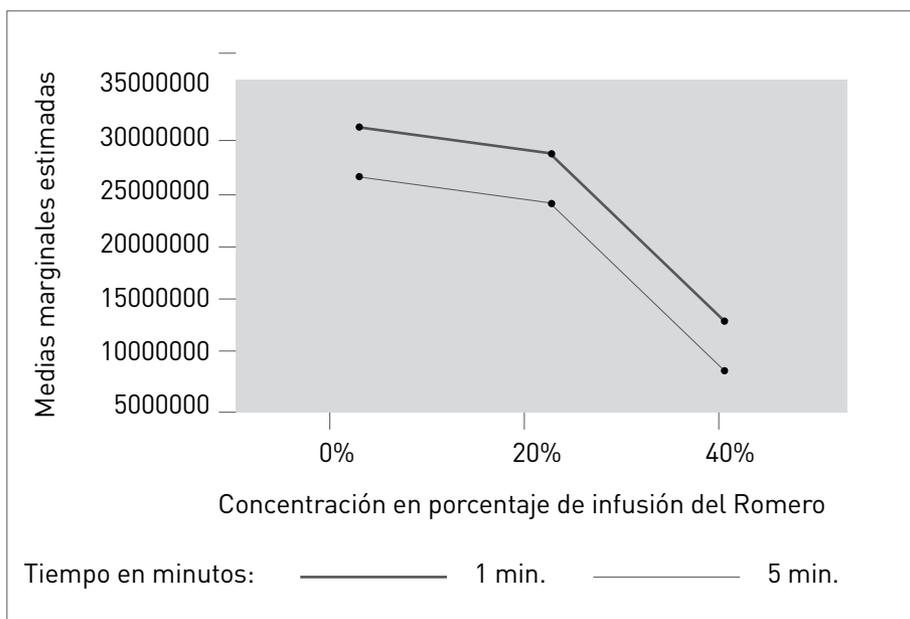
Nota: Desv. Típ= Desviación típica, N= Número de Tratamientos ,Variable dependiente: Repetición (resultado en mililitros) - Unid Exp

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 3 observamos que las medias en cantidades de UFC/ml del efecto inhibitorio de *R. officinalis* sobre *S. mutans*, disminuyen a medida que aumentan las concentraciones y los tiempos de exposición.

Figura 3:

Comparación en media de cantidades de UFC/ml en el efecto inhibitorio del Rosmarinus officinalis, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.



Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 3 el estadístico de Levene, prueba la hipótesis nula de igualdad de varianzas en UFC/ml del efecto inhibitorio de la infusión del Romero definida por la multiplicidad de factores. Puesto que, el estadístico nos arroja un valor de 28.285 con un valor de probabilidad de un valor muy pequeño ($3.02497E-06$) y que al compararlo con la región de probabilidad de rechazo en significancia al 0.05, se rechaza la hipótesis nula ($3.02497E-06 < 0.05$), por lo que decimos que uno de los grupos o todos los grupos de los factores tiene o tienen varianzas diferentes en concentración de UFC/ml con respecto a los demás.

Es importante desde aquí saber la igualdad o no de varianzas para poder después hacer interpretaciones más efectivas en los posteriores análisis.

Tabla 3

Prueba de Levene para contrastar la igualdad de varianzas de Cantidades UFC/ml en el Efecto inhibitorio del la infusión de Rosmarinus officinalis.

F	gl1	gl2	Significación
28,285	5	12	3.02497E-06

Nota: Variable dependiente: Repeticion (resultado en mililitros) - Unid Exp

Fuente: Elaboración propia.

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

Diseño: Intersección+Tiempo+Concentracion

En la Tabla 4, el análisis de ANOVA, la hipótesis nula supone, que el promedio de cantidades en UFC/ml en el efecto inhibitorio del *R. officinalis*, es igual en la multiplicidad de factores, tanto de la concentración como en el tiempo, como se aprecia, en la prueba se obtiene un valor significativo, entonces como todos los valores significativos son menores al valor de 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que a un nivel de significancia del 0.05, las medias de cantidades en UFC/ml en el efecto inhibitorio del *R. officinalis* son diferentes en las concentraciones con respecto a los demás grupos.

Tabla 4:

ANOVA para contrastar la igualdad de medias de Cantidades en UFC/ ml en efecto inhibitorio del Rosmarinus officinalis, obtenidas después de realizar la experimentación en base a la concentración porcentual de infusión de Romero en dos tiempos diferentes.

Fuente	Suma de cuadrados tipo I	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,647E+015 ^a	3	5,5E+014	41,377	3.29533E-07
Intersección	8,206E+015	1	8,2E+015	618,261	5.52074E-13
Tiempo	1,109E+014	1	1,1E+014	8,356	0.011857456
Concentración	1,537E+015	2	7,7E+014	57,887	1.70044E-07
Error	1,858E+014	14	1,3E+013		
Total	1,004E+016	18			
Total corregida	1,833E+015	17			

Nota: Variable dependiente: Repeticion (resultado en UFC/ ml) - Unid Exp, R cuadrado = ,899 (R cuadrado corregida = ,877), Gl= Grados de libertad, F= Valor calculado

Fuente: Elaboración propia.

Considerando qué:

Ho: Si $F_w < F_t$ No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

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

Interpretación:

Si $F_w < F_t$: se acepta H_0

Si $F_w > F_t$: e rechaza H_0 y se acepta H_a .

Como $F_w < F_t$: se acepta H_0 y se rechaza H_a .

En la Tabla 5 luego de hacer la prueba ANOVA (contraste de igualdad o diferencia de medias en forma global), se procede a hacer un análisis más exhaustivo. Para hallar la diferencia significativa se aplicó la prueba específica de Games-Howerd (Cuando se asume desigualdad de varianzas); tal realización se guió de la prueba de Levenne, donde se rechazó la hipótesis nula de igualdad, por lo que al utilizar un nivel de significancia del 0.05, en todos los pares de comparaciones, se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre ambos, por ello se concluye al final que en todas las medias de pares de Cantidades en UFC/ml en el efecto inhibitorio del *R. officinalis* son diferentes (significancias menores al valor pivot de 0.05).

Tabla 5
 Comparación múltiple para hallar la diferencia significativa de las Cantidades en UFC/ml en el efecto inhibitorio del *Rosmarinus officinalis*

Basado en las medidas observadas

* La diferencia de medias es significativas al nivel, 05

						Intervalo de confianza al 95%	
	(I) Conc. En porcentaje de infusión del Romero-Trat	(J) Conc. (%) de infusión del Romero-Trat	Diferencias entre medias (I-J)	Error Típ	Sign.	Límete inferior	Límete superior
Ga- mes- Howe	0%	20	2016666,67*	313492,9	0.000221214	1154163,43	2879169,90
		40	20530000,00*	31338263	0.002796993	10359812,93	30700187,07
	20%	20	-20166666,67*	313492,9	0.000221214	-2879169,90	-1154163,43
		40	18513333,33*	3135934	0.004485457	8340087,22	28686579,45
	40%	20	-20530000,00*	3138263	0.002796993	-30700187,07	-10359812,93
		40	-18513333,33*	3135934	0.004485457	-28686579,45	-8340087,22

Nota= Variable dependiente: Repetición (resultado en UFC/ml) – Unid Exp.

Fuente: Elaboración propia.

4. Discusión

Los resultados que se obtuvieron con la presente investigación mostraron que existe en la infusión de *Rosmarinus officinalis* un efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*. Esta inhibición se debe a los principios activos del romero, en tal sentido Estrada (2010), sostiene que dentro de estos principios se encuentran compuestos fenólicos como timol, cineol presentes en su aceite esencial por lo que presenta actividad antibacteriana sobre hongos y bacterias.

Así mismo, Castaño et al (2010) realizó una investigación sobre *Actividad Inhibitoria del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de R. officinalis L. (Romero) sobre algunas bacterias de interés alimentario*. En donde el aceite esencial exhibió un amplio espectro de la acción antimicrobiana, en bacterias Gram +; determinando así que las hojas de romero contienen compuestos con clara actividad antimicrobiana sobre microorganismos de importancia en contaminaciones alimentarias y justifica el potencial de aplicación en la industria de la investigación. García (1995), con la finalidad de realizar la investigación titulada efecto inhibitorio de la infusión del romero sobre microorganismos cariogénicos, *Lactobacillus acidophilus* y *S.mutans* determinó que La infusión inhibió el crecimiento de los microorganismos, como también de la enzima glucosiltransferasa, a las concentraciones 100%,60%, 20 %; y tiempos de exposición de 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos respectivamente.

En la presente investigación se pudo concluir que la infusión de *R. officinalis* a las concentraciones de 20% al minuto, inhibe el crecimiento de *S. mutans* en un 5.21%, de la misma manera a los 5 minutos inhibe el desarrollo en un 8.33%. Al 40% al minuto, inhibe el crecimiento de *S. mutans* al 46.87% y a los 5 minutos en un 95,35%, comparado con Castaño et al (2010), en la investigación titulada *Actividad Inhibitoria del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de R. officinalis L. (Romero) sobre algunas bacterias de interés alimentario*, mostró que el extracto etanólico de *R. officinalis* tuvo una concentración mínima inhibitoria de 0,13% para *S. mutans*, mientras que en nuestra investigación se encontró que hubo efecto inhibitorio al 20% y 40% sometido al minuto y a los cinco minutos, esto se debe a que se trabajó con infusión donde los componentes se encuentran diluidos.

5. Conclusión

1. La infusión de *Rosmarinus officinalis* "Romero" inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

2. La infusión de *Rosmarinus officinalis* presenta mayor inhibición a la concentración del 40% a los 5 minutos con un porcentaje de 95,35%, mientras que al minuto fue de 46.87%. Al 20% en un minuto de exposición inhibió el desarrollo de *Streptococcus mutans* en un 5.21% de la misma manera que a los 5 minutos inhibió en un 8.33% .
3. A mayor tiempo de exposición *Streptococcus mutans* con Infusión del *Rosmarinus officinalis* "Romero" mayor efecto inhibitorio.

6. Agradecimiento

Agradecemos a la docente de Metodología de la Investigación Científica, Carmen Calderón Arias por habernos brindado los conocimientos necesarios para la redacción del presente artículo científico, a nuestra familia que día a día nos motivan a seguir adelante.

7. Referencia Bibliográfica

- Castañó et al. (2010). *Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de Rosmarinus officinalis sobre algunas bacterias de interés alimentario* (1a ed.). Colombia: Editorial Vitae.
- Cosco, D. (2010). *Actividad inhibitoria del crecimiento de Streptococcus mutans y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la Matricaria chamomilla, manzanilla* (1a ed.). Lima.
- Estrada, S. (2010). *Actividad antibacteriana "in vitro" de los extractos de Romero y Tomillo frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923, Salmonella typhimurium ATCC 14028, Klebsiella pneumoniae, ATCC 13883, Candida albicans ATCC 10231 y Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* (1a ed.). Ecuador.
- Fonnegra et al. (2007). *Plantas medicinales arobadas en Colombia. International journal of medical microbiology*, 297(3):133-150, Jun 2007. Paris.
- García, (1995). *Efecto inhibitorio de la infusión del romero (Rosmarinus officinalis) sobre microorganismos cariogénicos, Lactobacillus acidophilus y Streptococcus mutans. In vitro*, (pág. 28 – 47). Biblioteca de la Universidad San Carlos, Guatemala.

Mayta, T. y Sacsquispe, T. (2009). *Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de MOSTACERO, I. BUSTAMANTE, O. RUIZ, M. Efecto inhibitorio in vitro de rosmarinus officinalis sobre streptococcus mutans.* Tesis de (maestría). Universidad Nacional del Centro.

MINSA. (2005). *Encuesta Nacional de Demografía y Salud Familiar.* Lima.

Moreno, S. (2009). *Propiedades antioxidantes y antibacterianas del romero ,Food Chemistry de Bioquímica Vegetal.* Instituto Leloir e investigadora independiente de Conicet. Argentina.

Moromi, H. (2009). *Antibacterianos orales.* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.

Silverstone et al. (1981). *Dental caries.* (1ª ed.). London: Ediciones Macmillan.