

**“ESTUDIO DE COMPROBACIÓN DE LA EFECTIVIDAD INHIBITORIA EN EL
CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CARIOGENICOS ESPECIE, SOMETIDOS A
LA INFUSION OBTENIDA POR PROCESO ETANOLICO DE QUERCUS PEDUNCULARIS
(CORTEZA DE ENCINO), ESTUDIO IN VITRO”**

Tesis presentada por:

JORGE ENRIQUE MÉNDEZ MUÑOZ

Ante el Tribunal Examinador de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de
Guatemala, que practicó el Examen General Público, previo a optar al título de:

CIRUJANO DENTISTA

Guatemala, octubre de 2016

**“ESTUDIO DE COMPROBACIÓN DE LA EFECTIVIDAD INHIBITORIA EN EL
CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CARIOGENICOS ESPECIE, SOMETIDOS A
LA INFUSION OBTENIDA POR PROCESO ETANOLICO DE QUERCUS PEDUNCULARIS
(CORTEZA DE ENCINO), ESTUDIO IN VITRO”**

Tesis presentada por:

JORGE ENRIQUE MÉNDEZ MUÑOZ

Ante el Tribunal Examinador de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que practicó el Examen General Público, previo a optar al título de:

CIRUJANO DENTISTA

Guatemala, octubre de 2016

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Decano:	Dr. Edgar Guillermo Barreda Muralles
Vocal Primero:	Dr. Edwin Oswaldo López Díaz
Vocal Segundo:	Dr. Henry Giovanni Cheesman Mazariegos
Vocal Tercero:	Dr. Jorge Eduardo Benítez De León
Vocal Cuarto:	Br. José Rodrigo Morales Torres
Vocal Quinta:	Br. Stefanie Sofía Jurado Guilló
Secretario:	Dr. Julio Rolando Pineda Cordón

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PÚBLICO

Decano:	Dr. Edgar Guillermo Barreda Muralles
Vocal Primero:	Dr. Guillermo Alejandro Ruiz Ordoñez
Vocal Segundo:	Dr. Sergio Armando García Piloña
Vocal Tercero:	Dr. Raúl Vitelio Ralón Carranza
Secretario:	Dr. Julio Rolando Pineda Cordón

ACTO QUE DEDICO

- A Dios:** Creador y dador de vida, por su amor incondicional, su favor, su gracia, misericordia y fidelidad, que me permite la gran bendición de llegar a este día tan anhelado, porque día con día estuvo a mi lado llenándome de abundantes bendiciones, y que cada día me daba las fuerzas para seguir aunque el camino no fuese fácil. Te amo Señor Jesús y toda la gloria y la honra sean sólo para ti.
- A mis padres:** Mario Enrique Méndez Kestler y María Eugenia Muñoz Méndez de Méndez; quienes son la mayor inspiración de mi vida, porque me han enseñado que la perseverancia es premiada, por estar cada momento de mi vida apoyándome y aconsejándome, por sus oraciones constantes y porque estuvieron presentes en cada momento de esta carrera, en las alegrías así como también en las tristezas, pero siempre tuvieron las palabras para darme aliento a seguir adelante; porque nunca dejaron de animarme ni de tener fé en mí, aún cuando muchas veces yo dudaba, los amo muchísimo y este triunfo también es de ustedes. ¡Lo logramos!
- A mis abuelos:** A pesar que tres de ellos ya no están presentes, pero los llevo siempre en mi mente y mi corazón, y sé que si estuvieran aquí, estarían muy orgullosos. Los amo. A mi abuelo Mario Méndez Moscoso, gracias por estar en mis momentos de triunfo.
- A mi familia:** A mi tía Rosy y tío Meme, quienes fueron en todo momento un apoyo incondicional a lo largo de esta carrera, porque siempre me brindaron una mano y respaldo en los momentos que más lo necesité, y sé que lo hicieron de todo corazón. También a mis tíos Jorge y Tere, mis tíos Paco y Mary, que siempre tenían alguna palabra de aliento para que pudiera continuar adelante, les agradezco mucho su cariño y sus oraciones. A mis demás tíos y tías, porque sé que a pesar de que muchas veces hubo distancia, sé también que he contado con su apoyo y cariño.

- A mis primos (as):** Porque han sido como los hermanos que no tuve, pero que siempre han estado presentes con su apoyo y las molestaderas que no olvido. Gracias por ser los mejores. ¡Los quiero mucho!
- A mis sobrinos:** Porque son una motivación para seguir adelante en la vida, y espero ser un ejemplo para ustedes también de lucha y perseverancia. Los amo.
- A mis amigos:** Que son la familia que uno elige. Gracias a todos y cada uno de mis amigos y amigas, tanto de esta facultad, como amigos de antes y de fuera, sé la clase de amigos que tengo y puedo decir que tengo los mejores. A mis amigos de fuera de la facultad, gracias por cada vivencia, que han sido muchas y que las recordaré toda la vida. A mis amigos de la facultad, que puedo decir, amigos y compañeros de mil batallas, vivimos muchas emociones juntas, realmente marcaron mi vida y me siento afortunado de contar con su amistad, por mencionar algunos, doctores: René, David, José, Raquel, Agueda, Aldo, Jaime, Jenniffer, Daniela, Francisco Ceballos, Anaite y María José; así como Jessica, con todos y cada uno de ustedes viví experiencias únicas en etapas diferentes, pero créanme que los llevo en el corazón. Gracias por darme el privilegio de conocerlos.
- A mis profesores:** A todos y cada uno de ellos, que siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos con mi persona, y por ser muchas veces un ejemplo a seguir, de profesionalismo, así como de amor por esta hermosa y bendita profesión. Mil gracias por su paciencia y dedicación en cada etapa de clases y clínicas, especialmente a doctores: Barreda, León, Valenzuela, Coronado, Quiñonez, Cheesman, Maas, Chinchilla, Fortuny, Orozco, y Escobar.
- A mis revisores:** A mi asesor Dr. Raúl Ralón por su apoyo, y guianza en mi trabajo de tesis, así como mis revisores Dr. Sergio García Piloña y Dra. Miriam Samayoa, por todo su apoyo y paciencia, así como ayudarme en todo momento, con la mejor actitud.

A la Facultad

de Odontología: Por abrirme sus puertas para mi aprendizaje profesional, por ser mi segundo hogar, y por darme muchas experiencias de vida a lo largo de esta carrera.

A la Universidad

De San Carlos de

Guatemala: Por ser mi alma mater, en donde he vivido los mejores años de mi vida. Y por darme el orgullo de pertenecer y ser sancarlista.

A todos los que me acompañan en este día y son partícipes de esta alegría, y no los mencioné anteriormente, les doy las gracias.

TESIS QUE DEDICO

A Dios: Por regalarme la vida y la sabiduría.

A mis padres: Por su apoyo incondicional en todo momento de esta investigación.

A mi asesor: Dr. Raúl Ralón por guiarme a lo largo de este estudio.

A mis revisores: Dr. Sergio García y especialmente Dra. Miriam Samayoa, que su asesoría y paciencia me brindaron una mejor comprensión del trabajo de investigación. Muchas gracias.

Al personal de laboratorio: Lic. Marco Vinicio García, Clarita Ortega y Doris, porque siempre me recibieron con una sonrisa y estuvieron dispuestos a ayudarme y guiarme en el trabajo de campo de esta tesis. Eternamente agradecido.

A la Facultad de Agronomía: Al Ingeniero Agrónomo David Mendieta, por su apoyo incondicional.

A la Facultad de Odontología: Que es mi segunda casa y me brindó todos los conocimientos necesarios para esta profesión.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala: Que me brindó una educación de excelencia.

A mi país Guatemala: Al cual soy digno de pertenecer.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Tengo el honor de someter a su consideración mi trabajo de tesis titulado **“ESTUDIO DE COMPROBACIÓN DE LA EFECTIVIDAD INHIBITORIA EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CARIOGENICOS ESPECIE, SOMETIDOS A LA INFUSION OBTENIDA POR PROCESO ETANOLICO DE QUERCUS PEDUNCULARIS (CORTEZA DE ENCINO), ESTUDIO IN VITRO”**, conforme lo demandan los estatutos de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, previo a optar al título de:

CIRUJANO DENTISTA

Y ustedes distinguidos miembros del Honorable Tribunal Examinador, reciban mis más altas muestras de consideración y respeto.

INDICE

I. Sumario.....	1
II. Introducción.....	2
III. Planteamiento del problema.....	3
IV. Justificaciones.....	4
V. Revisión de Literatura.....	5
VI. Objetivos.....	31
VII. Hipótesis.....	32
VIII. Variables.....	33
IX. Metodología.....	36
X. Recursos de Investigación.....	40
XI. Presentación de resultados.....	42
XII. Análisis y discusión de resultados.....	56
XIII. Conclusiones.....	60
XIV. Recomendaciones.....	61
XV. Limitaciones.....	62
XVI. Referencias bibliográficas.....	63
XVII. Anexos.....	66

I. SUMARIO

El presente trabajo de investigación, parte de la problemática que representa la enfermedad de caries dental, la cual puede ser prevenida y su proceso evolutivo alterado; es por ello que se realizó un estudio experimental in vitro, llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en donde se observó el comportamiento de los microorganismos cariogénicos *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, en relación a su crecimiento, en medios selectivos específicos adicionándoles el extracto de la corteza del árbol encino.

Para dicho estudio se recolectó una muestra de corteza de encino, previamente certificada por el herbario de la Facultad de Agronomía, y se procedió a tratarla bajo protocolo científico estricto, contando con la asesoría de un Licenciado Químico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; para obtener el extracto puro de dicha corteza, con la utilización de un rotavapor, y de esta forma poder adicionarla a los medios de cultivos para las bacterias. Así mismo para la obtención de bacterias, se adquirieron cepas estandarizadas a nivel mundial, que garantiza que dichas bacterias son puras y específicas, las cuales se utilizarían para este estudio.

Al ser un estudio in vitro, se prepararon medios de cultivo selectivos sólidos, los cuales fueron Agar-Rogosa, Mitis salivarius y Müeller Hinton. Se utilizó dos metodologías para evaluar el efecto del extracto sobre el crecimiento bacteriano, siendo una de ellas el método de discos de difusión, y el segundo método es en agar planta. Se prepararon los medios de cultivos de cada uno de los mencionados anteriormente, de los cuales se tomaría para grupos controles, y los otros como grupos de estudio, utilizando ambas metodologías respectivamente.

Realizadas las inoculaciones bacterianas, y transcurridas las 72 horas indicadas para la incubación, se procedió a observar los resultados, donde se midió el halo de inhibición alrededor del disco en la metodología de los discos de difusión, en el que se obtuvo una clasificación de acuerdo a esa medida; y en la otra metodología, se verificó si existió crecimiento total, parcial o no hubo crecimiento en las áreas de siembra de microorganismos en los medios de cultivos. El resultado obtenido tras revisar ambas metodologías, es que se presentó un crecimiento intermedio bacteriano, es decir, que hubo un crecimiento parcial en el método de las azadas, y un halo de inhibición de 15mm en promedio en los discos, concluyendo que el efecto del extracto de la planta es bacteriostático.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se conoce a la caries dental como una enfermedad infecciosa de distribución universal, debido a su alta prevalencia e incidencia. Es por ello que han surgido infinidad de estudios y pruebas a través de los años para tratar de prevenir dicho padecimiento.

En nuestro país el índice de caries es bastante elevado, por lo que surge la inquietud de buscar alternativas preventivas aun más que las curativas o restauradoras; tomando en cuenta que la gran mayoría de la población guatemalteca posee ingresos económicos bajos, se piensa en el estudio de las plantas medicinales como una alternativa de bajo costo para el tratamiento de las infecciones bucales de la población.

Se conoce que el uso de las plantas medicinales en Guatemala es muy frecuente, gracias a su fácil obtención y su bajo costo económico, sumado su fácil preparación, se busca obtener con el presente estudio, un respaldo científico que documente la eficacia de dichas plantas, ya que el uso de las mismas es una tradición en gran parte del territorio nacional ^(2, 3, 4), así como también respaldar las previas investigaciones.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es sabido que la caries dental es una enfermedad de origen multifactorial, que prevalece en la población mundial así como en la guatemalteca a través de generaciones; acarreado como resultado múltiples molestias para el individuo que la padece. Por su alta prevalencia e incidencia, se ha propuesto dar solución a esta enfermedad con la odontología restauradora.

Sin embargo con el pasar de los años, la práctica odontológica ha ido evolucionando a procesos menos invasivos, examinando llegar al ideal que es la prevención de dicha enfermedad, por medio de distintos métodos, buscando alterar el proceso de formación de caries dental.

Estudios previos han reportado que la producción de una infusión, a partir de la corteza del árbol de encino, posee efectos astringentes y de inhibición en el crecimiento sobre los microorganismos cariogénicos, ^(6, 18, 20) pensando en los microorganismos con mayor potencial en la producción de caries, siendo estos *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Si se toma en cuenta el nivel socioeconómico de nuestro país, así como la escasa accesibilidad a una atención dental de calidad en la mayoría de comunidades rurales, surge la inquietud de observar el efecto del extracto de la corteza del árbol *Quercus peduncularis* (encino), sobre las bacterias cariogénicas *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Al realizar una revisión de literatura de los estudios previos relacionada a este tema, se observa que el método de extracción de la corteza es basada en el recetario popular, que indica el proceso habitual de realización de una infusión, así como las cepas bacterianas estudiadas, son nativas, es decir tomada la muestra de la saliva de pacientes en edad escolar.

En base a todo lo anterior descrito surge la interrogante ¿Habría diferencia si en el método de extracción de la corteza se utiliza equipo de laboratorio (rotavapor) bajo un protocolo científico? Así como ¿tendrá efecto inhibitorio en el crecimiento de los microorganismos cariogénicos *S. mutans* y *L. acidophilus*, como está reportado en estudios previos? ¿Existe diferencia si se toma una muestra de cepas nativas como las reportadas en estudios previos, comparada a cepas estandarizadas?

IV. JUSTIFICACIÓN

Con esta investigación se busca iniciar la utilización del extracto de la corteza de encino, para la fabricación de un enjuague bucal a futuro, que sea de bajo costo y accesible para la población; el cual podría llevarse a cabo como un compromiso en conjunto con otras facultades, incluso universidades interesadas.

De igual manera, se proyecta generar nuevos datos y conocimientos en materia de prevención, en relación al proceso de caries dental.

Siguiendo la línea de investigación anterior a la presente, se busca poder responder a las interrogantes e inquietudes de la población de Guatemala sobre la eficacia de las plantas medicinales, las cuales son utilizadas considerablemente en las comunidades de nuestro país. Así mismo se pretende dar seguimiento a las recomendaciones propuestas en las investigaciones previas, las cuales sugieren el uso de mayor tecnología en el proceso de investigación.

V. REVISION DE LITERATURA

Las piezas dentales son parte esencial del aparato estomatognático, y debido al medio bucal en donde se encuentran, generalmente son atacadas con dos enfermedades de alta prevalencia a nivel universal, las cuales son: caries dental y la enfermedad periodontal.

Los dientes están formados en su estructura por esmalte, dentina, cemento y pulpa. El esmalte es la capa más externa de la corona anatómica dental que cubre a la dentina. La función específica del esmalte es formar una cubierta resistente y aislante para los dientes, haciéndolos adecuados para la masticación. ⁽¹⁹⁾

Es sabido que el esmalte dental está compuesto de tejido inorgánico, específicamente por prismas de hidroxiapatita que son sales cristalizadas de fosfato de calcio. Estos cristales de naturaleza mineral, representan el 97% de su contenido, mientras que el resto de su composición está constituido por el 2% de agua y el 1% de sustancia orgánica. La dentina, en cambio, es el tejido que aporta el mayor grado de constitución de las piezas dentarias. La dentina, a diferencia del esmalte, presenta una gran proporción de sustancia orgánica, principalmente colágeno denso y agua. Aunque también es importante mencionar que la dentina posee un 70% de sustancia mineral. ^(12, 15)

CARIES DENTAL

La caries dental es considerada en la actualidad como una enfermedad infecciosa de origen multifactorial y de distribución universal, es de carácter crónico, transmisible y posee una gran prevalencia en el ser humano. ^(13, 14)

Este padecimiento se caracteriza y determina por la destrucción localizada de los tejidos duros dentales, específicamente los tejidos mineralizados como lo son el esmalte, la dentina y el cemento.

Este padecimiento comienza en el tejido superficial, es decir el esmalte, si no se detiene su avance natural, esta afecta en forma progresiva a todos los tejidos dentarios provocando una lesión irreversible.

El término caries se deriva del latín *carious*, que significa podredumbre; que en sentido literal se refiere a la putrefacción de los dientes. Generalmente se le llama cavidades a las lesiones cariosas, o áreas de caries dental. En odontología, el término cavidad se refiere a una cavitación o agujero en un diente, debido a un proceso carioso. ⁽¹¹⁾

Como ya se menciona anteriormente, la etiología de la caries dental es multifactorial, siendo estos factores los siguientes: el huésped, el sustrato (es decir la dieta), el tiempo, y los microorganismos. Para que se inicie el proceso carioso, es necesario que estén presentes todos estos factores, ya que en presencia de todos y cada uno de estos, son los que componen el inicio de la lesión de caries. ⁽¹⁴⁾

Tratando de comprender el curso de la caries dental, se desarrollaron múltiples teorías acerca del proceso carioso, la etiopatogenia de la caries dental fue propuesta inicialmente por W. Miller en 1882. Actualmente es aceptada y comprobada la teoría acidogénica o bien llamada químico-parasitaria, propuesta en 1890. Lo que nos explica esta teoría es que los microorganismos usan los carbohidratos de la dieta usando como sustrato a la sacarosa, y produciendo ácido como resultado, iniciando de esta forma el proceso de desmineralización. ^(6, 14, 15)

Cuando una lesión cariosa da inicio, es observada como una lesión blanca, en donde el mayor grado de desmineralización se da en la subsuperficie, quedando cubierta por una pequeña superficie sin ser afectada, sin embargo, la lesión cariosa sigue su avance hacia los tejidos dentarios más profundos, dependiendo de factores extrínsecos e intrínsecos.

Esta lesión corresponde a una zona de esmalte blanco, tipo gris, opaca, típicamente observada por debajo de una capa de placa. La lesión punto blanco es indicación de descalcificación del esmalte subyacente. ⁽²⁰⁾

A este proceso se añade la disposición de los prismas de esmalte para que la lesión cariosa avance hacia la dentina.

Generalmente existen dos superficies en donde las lesiones cariosas son más comunes, siendo estas las superficies oclusales, específicamente en las fosas y fisuras de la anatomía dental, y las superficies proximales o interproximales. Cuando la lesión de caries inicia en la superficie oclusal tiene una forma de cono invertido, con la base hacia la superficie y el extremo del cono hacia la pulpa dental, esto es por la disposición de los prismas de esmalte en donde divergen en una zona radiada de dentro hacia fuera. A diferencia de cuando la lesión comienza en una zona interproximal la forma del avance

de la lesión es en forma triangular, de base externa y el vértice del triángulo hacia la unión amelodentinaria. ^(6, 11, 13, 15) Es de esta forma que nos explica que la lesión cariosa mientras se encuentra en esmalte, posee una forma definida en cuanto a su avance, gracias a su contenido mineralizado, inorgánico y la disposición de sus prismas de esmalte.

Sin embargo, una vez la lesión alcanza la unión amelodentinaria, la situación cambia, debido a que la estructura dentinal posee un contenido orgánico, por lo que la lesión comienza a crecer en tamaño y proporción, debido a que posee menores valores de mineralización lo cual favorece a una degradación cariosa mayor y su extensión en sentido lateral. ⁽²⁰⁾

Cuando la lesión de caries se encuentra activa, existe un intercambio de minerales entre la superficie del esmalte y el medio bucal, y a esto es lo que llamamos desmineralización, ya que influyen factores como las concentraciones de los minerales y el pH de la interfase. ⁽⁶⁾ Se entiende como desmineralización al movimiento excesivo de minerales desde el esmalte hacia el ambiente adyacente durante períodos prolongados, estando la lesión de forma incipiente.

En este preciso momento esta lesión aún se considera reversible. La lesión se considerará irreversible cuando la cantidad de los cristales sean removidos y se vea comprometida la matriz de proteína estructural, requiriendo una restauración dental.

Histológicamente, Silverstone dividió la lesión cariosa en zonas.

- Placa
- Superficie de esmalte y película
- Capa superficial intacta
- Cuerpo de la lesión
- Zona oscura
- Región translúcida.

La zona externa es esmalte superficial con poca alteración, que actúa como gradiente de difusión, permite que minerales como: Flúor, calcio, fosfato y otros iones, entren y salgan del esmalte; solo se pierde de 5 a 10% del contenido mineral de la capa superficial.

Por debajo de esta región se localiza el “cuerpo de la lesión”, es la zona principal de desmineralización y representa casi el 60% de la pérdida mineral. La tercera área se llama “zona

oscura” por el aspecto al microscopio de luz polarizada, y representa una región de pérdida mineral intermedia a las dos precedentes.

El frente de avance de la lesión, la “zona translúcida”, sufre una pérdida mineral semejante a la zona de superficie, es decir de un 5 a 10%.

A menos que se tomen medidas para detener e invertir el proceso, la lesión avanzará hacia la dentina; conforme se aproxima a la unión amelodentinal se diseminará en sentido lateral y se desintegra la capa superficial antes intacta, creando así una cavidad identificable clínicamente. ⁽²⁰⁾

Para que esto ocurra es necesario llegar a un punto crítico en la cavidad oral en donde el pH disminuya de 5.5 a 5.6 para que el esmalte se descalcifique. ⁽¹⁸⁾

FLORA BACTERIANA

Es normal que varios microorganismos estén alojados en el cuerpo humano, y la flora microbiana del cuerpo se divide en:

- Residente (nativa)
Se encuentra en sitios definidos, y depende de varias condiciones (temperatura, humedad, tensión de oxígeno, presencia o ausencia de sustancias inhibitorias y nutrición.
- Transitoria
Son los microorganismos que se instalan en el huésped por corto tiempo, proviniendo del medio ambiente, llamados también oportunistas y no necesariamente son patógenos.
- Suplementaria
Microorganismos que se identifican sólo en algunos individuos, quienes los albergan en escaso número pero por bastante tiempo.

Existe la posibilidad de que al haber un desequilibrio de la flora residente, la flora transitoria pudiera aumentar y en algún caso causar enfermedad. ^(6, 20)

Los dientes, surco gingival, mucosa bucal, lengua, saliva, etc. Son lugares donde los microorganismos se multiplican variando de zona a zona, teniendo cada una su población característica, siendo así la flora bucal una entidad dinámica, siendo afectada por numerosos cambios durante la vida del huésped. El desarrollo de la misma está condicionado por los siguientes factores:

- **Introducción**

Desde el nacimiento del huésped se introducen en la boca varios microorganismos, pero sólo algunos son capaces de establecerse en ella.

- **Retención**

Confinada a un sitio particular de la boca, como consecuencia de la interacción. Necesita de algunos requisitos:

- ◆ **Adherencia**

Es la habilidad de la placa dentobacteriana para permanecer fija al diente, aún con la masticación de los alimentos, acción muscular o presiones ejercidas por enjuagatorios bucales. Algunos microorganismos pueden adherirse a tejidos blandos (*S. salivarius*), a tejidos duros (*S. mutans*, *S. mitis* y *S. sanguis*) por la producción de un polisacárido extracelular metabolizado por otras especies; o defectos del esmalte, fisuras oclusales y fosetas, etc.

La adherencia inicial sucede cuando las bacterias que llegan se adhieren a los sitios de enlace de las proteínas que forman la Película Adquirida.

Las diferencias de cargas entre la superficie celular de la bacteria y la película pueden variar de acuerdo al tipo de bacteria y del tipo de proteína. Factores como inmunoglobulinas pueden competir por sitios de unión. Un segundo medio para la adhesión lo componen glucanos formados por colonizadores primarios. Muchas bacterias son puestas en contacto próximo con el esmalte cuando quedan atrapadas en fosas y fisuras durante la masticación. La cavidad bucal resulta un método de cultivo continuo.

Durante el periodo inicial de multiplicación es cuando las bacterias se encuentran en la *fase de desarrollo acelerado*.

Cuando el crecimiento da lugar a cierta población, existe competencia por los nutrientes entre células individuales en una misma colonia y otros microorganismos y

ello puede dar lugar a un retraso en la división celular, muerte de algunas células y el inicio de una fase de declinación del crecimiento o *fase estacionaria*.^(6, 20)

◆ **Sitios protegidos**

La matriz adherente de la placa proporciona un hábitat protegido para bacterias que no puede adherirse, siendo el surco gingival el sitio protegido de mayor tamaño, en donde sobreviven bacteroides melaninogénicos y espiroquetas.

◆ **Fuerzas de desprendimiento**

Entre ellas se encuentran: el flujo salival, acción abrasiva de los alimentos, movimiento de la lengua y tejidos blandos, circulación del líquido del surco gingival y la fagocitosis en el surco.

◆ **Multipliación**

Hay 4 formas para que pueda llevarse a cabo la multiplicación:

➤ ***pH***

Las bacterias inhibidas por pH bajo no pueden sobrevivir en condiciones ácidas de la placa dentobacteriana o bajo la base de una prótesis.

➤ ***Oxido-Reducción***

El potencial REDOX es muy importante. Los microorganismos anaerobios sólo se desarrollarán en ambientes reductores. Potencial REDOX bajo, sólo se encuentra en el surco gingival y en la capa profunda de la placa dental.

➤ ***Disponibilidad de sustratos***

Los microorganismos deben ser capaces de metabolizar sustratos disponibles de la dieta o productos metabólicos de otros microorganismos adyacentes.

➤ ***Interacciones microbianas***

Existen varias relaciones de Mutualismo

- Simbiosis: Es una interacción en donde ambos tipos de microorganismos se benefician.
- Comensalismo: Una de las especies se beneficia mientras la otra no se altera y no obtiene ventajas. A los microorganismos comensales que tienen potencialidad de causar enfermedades infecciosas se les llama Anfibiontes.
- Antibiosis: Es una relación de antagonismo, la cual es importante para el huésped porque regula la población microbiana e impide el crecimiento exagerado de algunos microorganismos.
- Sinergismo: Diversos microorganismos producen una reacción que no sería posible si crecieran solos.

Las relaciones no son permanentes, el ambiente y otros factores pueden cambiar una relación de simbiosis a la de antagonismo o, a otro tipo. La producción de catabolitos finales (ácidos, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno) inhiben a los patógenos no residentes.

Por estimulación del sistema inmune del huésped como nutrientes y ayudan a mantener un mejor estado de salud. ^(6, 13, 14, 20)

PLACA BACTERIANA

Conocida como una biopelícula que baña las superficies dentarias, y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) corresponde a una entidad bacteriana proliferante con actividad enzimática que se adhiere firmemente a las superficies dentarias y que por su actividad bioquímica y metabólica ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries dental. Generalmente es formada por el acumulo de las bacterias, proteínas salivales, residuos epiteliales y restos alimenticios, tomando la forma de placa. ^(14,19)

Esta adherencia es mayor en aquellas caras dentales que no son fáciles de limpiar, por ejemplo en dientes apiñados o mal posición dentaria, o bien en zonas proximales. ⁽¹²⁾ Una vez formada la placa bacteriana se hace difícil removerla. Su aspecto clínico habitual es de color blanco, y esta adherido a la superficie del diente simulando una película. ⁽¹⁸⁾ Esta película dental comienza a adherirse a las superficies dentarias a las dos horas de concluida la higiene oral. ⁽¹²⁾

Es necesario resaltar también que, la placa bacteriana en condiciones normales no es un ecosistema patológico, Su formación es un proceso normal que ocurre en la boca de todas las personas y su presencia es, hasta cierto punto, beneficiosa ya que actúa como una barrera frente a la colonización de microorganismos extraorales, a menudo patógenos. ⁽¹³⁾

Es importante mencionar que esta placa bacteriana debe su formación gracias a una pobre o mala higiene oral.

El proceso comienza con la formación de una matriz aglutinante compuesta por glucoproteínas presentes en la saliva, que son precipitadas sobre las superficies duras del diente. Este film sirve de trama para el depósito de diferentes colonias de microorganismos típicos de la flora bucal. ⁽¹²⁾

La composición de esta placa bacteriana varía según el tiempo de maduración y la región de la pieza dentaria colonizada. A esta placa se la ha descrito como una estructura formada por dos matrices o fases principales, las cuales son,

- La capa salival o cutícula (película) acelular adquirida.
- La capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares, o bien la placa dental propiamente dicha.

CUTÍCULA O PELÍCULA ACELULAR ADQUIRIDA

Es una biopelícula delgada, amorfa y electrodensa inmediatamente adyacente a la superficie del esmalte. Esta se forma en no más de dos horas en una superficie dental limpia, denominándola cutícula temprana; ésta carece de bacterias y sus productos están formados por proteínas y glucoproteínas. En las cutículas las fosfoproteínas de la saliva participan en el proceso de remineralización – desmineralización. ⁽¹⁴⁾

Esta película se forma a medida que los dientes erupcionan y cuando están formados por completo es de incolora, a un tono café claro a gris. La explicación del por qué esta película está libre de bacterias, se debe a que esta membrana amorfa posee grupos sulfatos y carboxilos, presencia que aumenta las cargas negativas de la superficie dental teniendo las bacterias igual carga negativa, se produce un efecto de repulsión entre las superficies y las bacterias. ⁽¹⁹⁾

La película se divide en:

- Película superficial: Constituida de la capa inicial de proteínas salivales.
- Película subsuperficial: Los mismos elementos de la película superficial pero se dirige hacia abajo en los defectos de la superficie del esmalte causado por imperfecciones en la superficie o por la desmineralización ácida.
- Película suprasuperficial: Se encuentra entre la película superficial y la bacteria.

La absorción selectiva de las proteínas salivales sobre la superficie del esmalte, será lo que determinará la composición de la película adquirida. Una de las funciones de la película adquirida es servir de protección de la superficie del diente del desgaste excesivo por la masticación actuando como lubricante, así mismo protege contra el ataque ácido (alimentos ácidos). Es semipermeable, reduciendo la pérdida de iones calcio y fosfato desde la superficie del esmalte. ⁽⁶⁾

Con el tiempo la película temprana sufre modificaciones y se transforma en una película tardía en la que se asocian componentes de la saliva, productos bacterianos y exudado gingival. Para que exista la colonización bacteriana depende de una película pre-existente y al iniciar la colonización se inicia la placa dentobacteriana; es aquí donde la película actúa como barrera pasiva que altera la proporción en la que los ácidos difunden la placa a la superficie dental, recíprocamente. ^(6, 14)

PLACA DENTOBACTERIANA O CAPA FORMADA POR MICROORGANISMOS Y POLÍMEROS EXTRACELULARES

Es de origen bacteriana en contraste con la película adquirida. En su forma madura consiste de miríadas de microorganismos embebidos en una matriz gelatinosa relativamente insoluble, que es básicamente mucopolisacárida. Al parecer se origina inicialmente en rupturas mínimas y defectos de la superficie del esmalte o por la coalescencia y el depósito de microorganismos de la saliva. En su forma madura la placa dentobacteriana contiene muchas bacterias localizadas en los mucopolisacáridos relativamente insolubles, es acidófila positiva y grampositiva.

Para el estudio de la microflora oral se utiliza la coloración Gram, y es de importante significado para diferenciar morfológicamente a las bacterias, levaduras, hongos y protozoos. En sí la técnica utiliza como método de tinción el cristal violeta y se usa para diferenciar en dos grupos la

microbiota oral, aquellos que retienen la tinción, se llaman Gram positivos, y los organismos que la pierden, pero toman el color rojo se llaman Gram negativos. ⁽¹⁹⁾

Existen varios mecanismos que intervienen en la colonización inicial de las superficies dentarias por las bacterias y en su desarrollo y multiplicación posterior dentro de la placa,

1. Adherencia a la película adquirida (colonización primaria).
2. Agregación interbacteriana (colonización secundaria).
3. Multiplicación (colonización secundaria).

COLONIZACIÓN PRIMARIA

Una vez establecida la película adquirida y en ausencia de una higiene oral adecuada, comienzan a depositarse las primeras poblaciones bacterianas en forma específica.

Los primeros elementos microbianos de la placa son por lo general oxígeno tolerante (gram positivos). Aparecen en los primeros días de formación de la placa, la placa se forma aproximadamente a las 6 horas de una limpieza, iniciándose como colonias aisladas, continuando la expansión durante las primeras 48 horas, estos colonizadores comienzan a reproducirse y metabolizar activamente. Se puede mencionar entre ellos a los Estreptococos y Lactobacilos.

Existen propuestas sobre varios mecanismos que expliquen la adsorción selectiva de las bacterias sobre la película, ya que la existencia de cargas negativas sobre las bacterias y las glucoproteínas tienden a dificultar la unión entre ambas. Sin embargo, los iones calcio presentes en la saliva pueden neutralizar las cargas y actuar como puentes entre la película y las bacterias.

Al inicio la colonización se efectúa sobre la base de estreptococos gram positivos, especialmente *S. sanguis*. También es posible observar algunos bacilos cortos. Esto puede durar un par de días.

El papel de *S. mutans* en esta fase es variable dado que hay placas no cariogénicas en las que se los encuentra en bajo número o ausentes. ^(6, 14, 15)

COLONIZACIÓN SECUNDARIA

Luego de la etapa de la colonización primaria, se produce la etapa de colonización secundaria y maduración, en la que la placa sufre modificaciones estructurales. En esta etapa todo el mecanismo depende exclusivamente de la sacarosa y de la síntesis extracelular de polímeros de glucosa a partir del desdoblamiento de la sacarosa en glucosa y fructosa.

Una vez existe presencia de sacarosa, las cepas de *S. mutans* comienzan a sintetizar polisacáridos extracelulares conocidos como glucanos insolubles (mutanos), los cuales actúan como verdaderos adhesivos extracelulares. Es así como los estreptococos sintetizan su propia sustancia adhesiva que servirá para unirlos entre sí y al diente.

En un inicio la biopelícula está formada por cocos grampositivos, pero posteriormente se desarrolla una población compleja de otros cocos, bacilos y filamentos grampositivos. Por ende, todo esto provoca un marcado aumento en el grosor con incorporación y proliferación de diversos gérmenes.

En otras palabras, la placa es un conglomerado bacteriano proliferante y enzimáticamente activo que está fuertemente adherido a la superficie dentaria, la cual necesita energía, que toma de los hidratos de carbono fermentables provenientes de la dieta, de esta forma produce ácidos que producen la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita y así iniciará el proceso carioso.

El incremento en el grosor de la placa limita la difusión de oxígeno a poblaciones que son oxígeno tolerante, los microorganismos que sobreviven en las partes más profundas de la placa son los facultativos o anaerobios obligados.

Las bacterias de la placa tienen la habilidad de captar los nutrientes de forma activa, de modo que el transporte de los azúcares al interior de la célula se hace por dos mecanismos, el de la fosfoenol transferasa y el de las permeasas. Los *S. mutans*, *S. salivarius* y *S. sanguis*, disponen de un sistema para el transporte de azúcares que es el de la fosfoenol transferasa. (6, 14, 20)

MICROORGANISMOS CARIOGÉNICOS

STREPTOCOCCUS

Son cocos grampositivos agrupados en pares o cadenas, no esporulados e inmóviles que presentan un metabolismo fermentativo y son anaerobios facultativos. Constituyen el grupo más numeroso de la cavidad bucal, representando del 20 al 30% del total de las bacterias, también se encuentran en el tracto respiratorio superior de los hombres.

Se pueden clasificar en tres subgrupos mayores de acuerdo a la base de su desarrollo en agar sangre:

- Alfa hemolíticos: Producen hemólisis parcial, dan un área verde alrededor de las colonias bacterianas en el medio de cultivo.
- Beta hemolíticos: Producen hemólisis total, originan una zona clara alrededor de las colonias en el medio de cultivo.
- Gamma hemolíticos: No producen hemólisis.

La mayoría de los estreptococos de la cavidad bucal son considerados alfa-hemolíticos. ^(14, 15)

El estreptococo mide 0.5 a 1 micra de diámetro. Suelen desarrollarse a un pH entre 7.4 y 7.6. Aunque su desarrollo ocurre entre 15⁰C y 40⁰C, la temperatura óptima de cultivo para la mayor parte de los estreptococos es de 37⁰C.

STREPTOCOCCUS MUTANS

Especie que fue descrita por Clarke en 1924, a partir de la caries de dentina. Su primer hábitat es la superficie dentaria del hombre, y su presencia en la placa bacteriana se ve favorecida por el alto nivel de sacarosa de la dieta.

Existe una relación directa entre el número de *S. mutans* y la presencia de caries dental, por lo que un recuento bacteriano alto, como 1×10^6 UFC por mililitro de saliva, indican un alto riesgo de caries dental.

Debido a su habilidad para producir caries dentales, se le describe como *S. mutans* “*cariogénico*”; esto relacionado a su capacidad de producir ácido láctico al metabolizar la sacarosa. *S. mutans* puede sintetizar polímeros extracelulares solubles (dextranos, fructanos) e insolubles (mutanos) a partir de la sacarosa. Estos polímeros insolubles desempeñan un papel fundamental en la adhesión de *S. mutans* a la superficie dentaria. Es por esto que no se aísla de la cavidad bucal antes de la erupción de los dientes temporarios. ^(13, 14)

El *S. mutans* ha sido reconocido como el agente etiológico de la caries dental. En cultivos agar mitis-salivarius, son fácilmente diferenciados por sus colonias altas, convexas y mucoides, con márgenes ondulados y una estructura interna, reminiscente característica finamente granular de aspecto de vidrio escarchado. ⁽⁶⁾

El crecimiento de *S. mutans* es más abundante anaeróbicamente en presencia de 5% de CO₂ y de 95% de Nitrógeno que aeróbicamente.

El *S. mutans* crece rápidamente y producen su acidez terminal (aproximadamente pH4) dentro de las 24 horas. Todas las cepas de *S. mutans* fermentan al manitol y sorbitol.

La pared celular consta de 6.8% de proteína, 8.9% de ácido teicoico glicerol, 33.6% de polisacárido no peptidoglucano y 49.9% de peptidoglucano. ^(15, 18)

Bajo varias circunstancias *S. mutans* puede actuar como un patógeno oportunista.

La ruptura del esmalte dental por los productos de fermentación ácidos durante el desarrollo de la lesión cariosa da como resultado la invasión de la dentina por los microorganismos y por último la infección pulpar. ^(18, 20)

Durante la ingesta de alimentos, la concentración de azúcares en la cavidad oral aumenta hasta 10.000 veces sobre la concentración en ayunas. Los azúcares entran rápidamente en las bacterias y se produce una acumulación de productos intermedios del metabolismo glicolítico, que producen la intoxicación y muerte de la célula.

El *S. mutans* tiene varios mecanismos para protegerse del exceso de azúcares, como son la síntesis de polisacáridos extra e intra celulares, el incremento del ritmo de la glicolisis y la llamada puerta de lactato, que consiste en la activación de una enzima, la lacto/deshidrogenasa, que actúa sobre los productos intermedios de la glicólisis y los degrada rápidamente a ácido láctico, el cual se produce en grandes cantidades. Esta gran producción de ácido láctico en

presencia de un elevado aporte de carbohidratos fermentables (especialmente sacarosa), tiene gran importancia para el inicio de la caries dental. ⁽²⁰⁾

El *S. mutans* coloniza particularmente las fisuras de los dientes, y las superficies interproximales, tiene todas las propiedades asociadas con el poder cariogénico de un microorganismo.

Se ha demostrado experimentalmente que *S. mutans* destruye el hueso periapical cuando se inocula dentro de la pulpa dental y que el mismo organismo se aísla de la sangre hasta 21 días después de la inoculación.

Se sabe que la endocarditis bacteriana que resulta de *S. mutans* se presenta después de un trabajo dental menor incluyendo al que se realiza en un paciente que sufre de insuficiencia de la válvula mitral y se sujetó a una limpieza dental bajo una cubierta de eritromicina.

La terapia profiláctica contra la endocarditis bacteriana que es producida por *S. mutans* es probablemente más efectiva con el uso de ampicilina combinada con gentamicina. ⁽¹⁵⁾

LACTOBACILLUS

En la actualidad se aceptan unas 43 especies dentro del género *Lactobacillus*, nueve de las cuales pueden ser aisladas de la cavidad bucal. Las células tienen forma de bacilos y suelen agruparse en cadenas.

Son microorganismos no esporulados e inmóviles, son grampositivos pero pueden tornarse gramnegativos en cultivos envejecidos. Los Lactobacilos tienen dos propiedades, son acidogénicos y acidúricos. Sobreviven y se reproducen en condiciones de acidez. ^(13, 14, 15)

En la saliva de los adultos suman desde 0 a aproximadamente 100,000 por milímetro o más. ⁽²⁰⁾

Con respecto a su reacción frente a la glucosa se pueden denominar “homofermentativas” a las especies que sólo producen ácido láctico y “heterofermentativas” a las que además de ácido láctico elaboran otros productos, como ácido acético, etanol y dióxido de carbono.

En la cavidad bucal se hallan especies de ambos grupos. Las homofermentativas no crecen a 15°C en tanto que las heterofermentativas sí.

Las homofermentativas son las más importantes en relación con las caries dentales. Se las asocia con la progresión de la caries dental cuando el pH ya descendió a 5,4 o menos. Asimismo, son proteolíticas.

En la cavidad bucal existen dos especies: *L. acidophilus* y *L. salivarius*; ambas son homofermentativas y metabolizan la glucosa por la vía glucolítica del ciclo de Embden-Meyerhof, con elevada producción de ácido láctico.

Los Lactobacilos se consideran invasores secundarios, se encuentran entre las bacterias más acidófilas que se conocen, ya que son capaces de producir ácidos en un pH muy bajo (acidúricos). Son denominados acidúricos debido a que toleran un nivel de acidez que por lo regular destruye a otras bacterias no esporuladas. ^(14, 18, 20)

A pesar de estas características cariogénicas, los lactobacilos presentan poca afinidad por las superficies dentarias y en consecuencia no se les implica en el comienzo de las caries de esmalte; no obstante, son los primeros implicados en el avance de las caries de dentina. ⁽¹⁴⁾

El pH óptimo es de 5.5 a 5.8. El aislamiento y enumeración de lactobacilos orales se facilita por medios selectivos de agar Rogosa, que suprime el crecimiento de los demás microorganismos orales por su alto contenido de acetato y otras sales, es depresor de la tensión superficial; la mayoría no son proteolíticos, no producen indol, no reducen el nitrato y son catalasa negativos. ⁽²⁰⁾

Estos microorganismos actúan principalmente como “invasores secundarios” que aprovechan las condiciones ácidas y la retentividad existente en la lesión cariosa. Dependen fundamentalmente de la acción anterior de los estreptococos del grupo *mutans*. Si existen altas concentraciones de lactobacilos en saliva (>100.000/mL) es un excelente indicador del “riesgo de progresión” de las caries iniciales existentes. ^(13, 14)

LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS

Pertencen a la clasificación de lactobacilos homofermentativos microaerófilos, se encuentra en el intestino de casi todos los vertebrados mamíferos y algunos invertebrados.

Su cantidad aumenta en relación al aumento de la ingesta de carbohidratos en la dieta y pueden llegar a ser predominante cuando se tiene una dieta láctea, son bastante gruesos y de

longitud variable, se disponen aislados a pares ligeramente flexionados en la unión y en cadenas largas.

Las cadenas largas tienen formas filamentosas y las formas de masa no son raras. Los cultivos jóvenes se tiñen uniformemente grampositivos. Poseen reacciones de fermentación variables, aunque la mayoría producen ácido pero no gas. A partir de la glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa llegan a coagular la leche en 48 horas.

Los lactobacilos se encuentran en las regiones cervicales de los dientes.

La frecuencia con que los lactobacilos se presentan en la encía disminuye cuando la persona se vuelve edéntula, pero vuelven a presentarse en niveles mucho más altos que los de las personas con dientes naturales cuando se les insertan prótesis totales.

Los *L. acidophilus* vivos de origen tanto dental como intestinal producen lesiones de unión en los conejos. Este organismo puede causar endocarditis. ⁽¹⁸⁾

MATRIZ DE PLACA BACTERIANA

Se encuentra constituida por polímeros (proteínas salivales y bacterianas) más productos finales bacterianos, (productos difusibles de desecho del metabolismo bacteriano), además de enzimas bacterianas extracelulares y es parte constituyente de la placa dental junto a las bacterias.

Su contenido orgánico consiste en proteínas y polisacáridos (30% carbohidratos y 30% proteínas) más lípidos (15%), productos extracelulares de las bacterias de la placa, su citoplasma y restos de membranas celulares, restos alimenticios y derivados de glucoproteínas salivales siendo el carbohidrato predominante el **dextrano**, y otros en menor cantidad como levano, galactosa, metil-pentosa en la forma ramanosa.

Su contenido inorgánico son principalmente el Calcio y el Fósforo, Magnesio, Potasio y Sodio en pequeñas cantidades cada uno, todos unidos al contenido orgánico, en menor cantidad en la placa supragingival temprana y en mayor cantidad en la placa que se transforma en cálculo.

Si se aplica Flúor tópicamente en los dientes, en el agua bebida, pasta dental o colutorios, el Flúor se incorpora a la placa. El Flúor puede activar la muerte de los microorganismos directamente o ayudando a la remineralización de la superficie dental. ^(6, 20)

VARIACIONES DE LA PLACA DENTOBACTERIANA

- Placa de la superficie lisa (supragingival)
- Placa subgingival: la protección de tejidos gingivales asegura que los depósitos de la placa sean menos afectados por cambios en el medio bucal. El descenso del potencial REDOX se logra con mayor rapidez en este ambiente, esta placa madura en menos tiempo que la supragingival y al tercer día de su desarrollo, la placa subgingival puede parecerse a una supragingival de 14 días.
- Placa proximal: *Actinomyces Vicosus/Naeslundii* es el microorganismo predominante menos tiempo que la supragingival y al tercer día de desarrollo, la placa subgingival puede ser seguida de *Actinomyces Israelii*, *S. sanguis*, *S. mutans*, etc.
- Placa de fosas y fisuras oclusales: las partes más profundas de las fisuras oclusales contienen pocas bacterias viables y numerosas células muertas.

La placa dental no es un residuo alimenticio. La placa supragingival se forma rápidamente cuando se duerme, cuando no se ingiere comida a consecuencia de la ausencia mecánica de los alimentos y en aumento del flujo salival causado por la masticación. Los pacientes con xerostomía registran mayores cantidades de placa supragingival. ^(6, 20)

MEDIOS DE CULTIVO Y SIEMBRA

MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos en el laboratorio. El objetivo es aislar las diversas especies, proceder a identificarlas o llevar a cabo estudios complementarios.

El crecimiento de los microorganismos dentro de un medio de cultivo o sobre él se denomina cultivo microbiano. ⁽¹⁴⁾

Las condiciones que debe reunir un medio de cultivo son las siguientes:

- Debe contener nutrientes adecuados para el microorganismo.
- Contener humedad suficiente.
- Poseer un pH ajustado.
- Ser estéril inicialmente.

Cuando un medio de cultivo es sólido, se le llama agar y se obtiene cuando un medio de cultivo líquido se le añade una sustancia gelificante como el agar. Estos medios se colocan en cajas de petri o en tubos de ensayo. ⁽¹⁴⁾

Existen medios de cultivo selectivos, los cuales permiten el crecimiento de determinado tipo de bacterias mientras que inhiben el desarrollo de otros gérmenes. De igual forma, existen medios de cultivo enriquecidos, que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos exigentes en cuanto a sus requerimientos nutritivos e inhiben parcialmente al resto de los gérmenes. ⁽¹⁴⁾

SIEMBRA

Sembrar un microorganismo es colocarlo en un ambiente artificial apropiado para que lleve a cabo su metabolismo, su desarrollo y su reproducción. Una condición básica de la siembra es que se realice bajo rigurosas reglas de asepsia. La siembra tiene como finalidad el cultivo, que es el crecimiento de poblaciones microbianas en un medio de cultivo bajo condiciones de laboratorio.

SIEMBRA POR AGOTAMIENTO POR ESTRÍAS

Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo (material microbiano utilizado para sembrar un medio de cultivo) sobre un medio sólido contenido en una cápsula de Petri. A medida que se realizan las estrías o azadas, las bacterias pasan del asa al medio en un número cada vez menor, de manera que las estrías iniciales proporcionan un crecimiento confluyente mientras que a lo largo de las últimas estrías se desarrollan colonias bien aisladas. ⁽¹⁴⁾

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD IN VITRO

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN CAJAS DE PETRI

Representa la prueba de susceptibilidad más ampliamente utilizada en bacteriología clínica porque permite obtener resultados bastante exactos mediante un método estandarizado, sencillo, de ejecución rápida, económica y fácil de reproducir.

Existen ciertas normas que deben tenerse en cuenta:

Condiciones de la cepa

- Debe aislarse del material en estudio.
- Debe obtenerse en forma de cultivo puro.
- Debe ser el agente etiológico del proceso infeccioso.

Cualidades de los discos de papel

- Deben tener un tamaño de 5 a 7 mm y un espesor de 0.02 mm.
- Deben cargarse con una concentración de antimicrobiano o agente en estudio selectivo de manera que se obtenga una zona de inhibición no mayor de 40 mm.
- La cantidad de antimicrobiano selectivo que contiene cada disco debe ser justa porque una sobrecarga falsearía los resultados.

Requisitos del medio de cultivo

- Que posea resultados satisfactorios con las cepas de referencia.
- Posee un pH de 7.2 a 7.4.

Indicaciones para la preparación de las placas

- El medio deberá distribuirse uniformemente en la caja.
- La altura del medio debe ser de 4 mm para que se pueda estandarizar la difusión de la droga porque si se disminuyera el espesor de la capa de agar se obtendrían halos de inhibición más amplios. ⁽¹⁴⁾

TÉCNICA DE DISCOS DE DIFUSIÓN

A partir de un cultivo puro del microorganismo, se toman algunas colonias y se las suspende en un caldo, se incuba entre 2 y 5 horas, de manera de obtener una turbidez final de 0.5 en la escala de Mc Farland, que equivale a unas 10^8 UFC/mL. Inmediatamente se sembrará una placa con agar según la siguiente técnica:

Diseminación en superficie

Se embebe un hisopo de algodón estéril en el inóculo, se elimina el exceso de líquido contra las paredes del tubo y se aplica sobre la superficie del agar en zig-zag (asegurándose de cubrir perfectamente toda el área).⁽¹⁴⁾

Seguidamente se deja secar entre 3 y 5 minutos, luego con una pinza estéril de puntas finas se colocan sobre la superficie del agar sembrado discos individuales.⁽¹⁴⁾

Con respecto a los discos debe tenerse en cuenta que, para asegurar un contacto adecuado y por lo tanto una difusión uniforme se los debe presionar suavemente, y para impedir la superposición de los halos de inhibición deben estar a una distancia no menor de 15 mm entre sí y a 1.5 cm del borde de la caja.

Luego se incuba durante 12 a 18 horas a 37°C, una vez transcurrido dicho lapso se procede a la medición e interpretación de la zona que circunda el disco, llamada halo de inhibición. Éste informa si el microorganismo es sensible, resistente o intermedio.⁽¹⁴⁾

MEDICINA POPULAR EN GUATEMALA

Es conocido que nuestro país posee una gran riqueza cultural, heredada gracias a nuestros antepasados, quienes se apoyaban en la sabiduría de la naturaleza para, en muchas ocasiones curar o aliviar sus padecimientos o enfermedades.

De este modo, fue como el hombre busco los recursos que tenía a la mano para encontrar cura a sus dolencias, siendo un recurso el uso de las plantas, dando como resultado el descubrimiento a las plantas con efectos medicinales.⁽¹⁸⁾

En Guatemala, la mayoría de la población busca solucionar sus problemas de salud en la medicina popular, que no es más que la medicina que se ha practicado con aparente eficacia, sin embargo, todo el proceso de inspiración, revelación, adiestramiento y práctica de la medicina popular, está empapado en el misterio. ^(6, 18)

Como se presume, las comunidades indígenas son todavía muy tradicionalistas y aunque en forma indirecta reciben la influencia de la cultura occidental, conservan para la restauración de la salud sus métodos y sistemas ancestrales a través de personas especializadas en el diagnóstico y tratamiento de afecciones tanto físicas como sobrenaturales.

En la actualidad, a pesar de la gran variedad de medicamentos sintéticos y el papel fundamental que juegan en la medicina moderna, las plantas medicinales conservan aún su importancia. Y es necesario mencionar que, aunque la investigación medicinal actual se encauce hacia la más sofisticada biotecnología y gran parte del gremio médico considere absurdo el uso del herbario medicinal, el concepto terapéutico de los compuestos químicos naturales se está modificando gradualmente en todos los países. ^(6, 18)

El programa de la OMS sobre medicina tradicional forma ahora parte integrante del programa mundial de la OMS, relativo a la gestión de los medicamentos y la política farmacéutica. Tal vez los motivos principales de ese cambio sean los siguientes: primero, la importancia reconocida de las plantas como fuentes de productos de valor medicinal y segundo, el reconocimiento de que se necesita una infraestructura tecnológica apropiada para realizar ese potencial. ⁽¹⁸⁾

Existe un amplio número de plantas que no se han estudiado, o bien los estudios que existen son escasos y en la mayoría de los casos con un enfoque reducido. Si tomamos en cuenta que la flora Mesoamericana es muy diversa y variada, representaría un valioso recurso a explorar y desarrollarlo.

El programa de la OMS sobre medicina tradicional ha establecido dos estrategias fundamentales para la fabricación y el uso agroindustrial de plantas medicinales de componentes normalizados activos desde el punto de vista farmacológico.

1. La aplicación de técnicas conocidas y eficaces al cultivo, la elaboración y la fabricación de plantas medicinales a fin de satisfacer las necesidades de salud en forma culturalmente aceptable y de promover la autonomía.

2. La distribución de semillas o plantas a las personas y comunidades para cultivarlas en los huertos familiares y consumirlas como infusiones.

En los últimos años se ha despertado el interés del público por el uso de remedios y prácticas tradicionales, en particular de hierbas y otras plantas.

Es necesario garantizar la inocuidad del uso de plantas medicinales y de los remedios derivados de ellas exige no sólo medidas de control sino también un notable esfuerzo de información pública y enseñanza profesional.

Es importante mencionar también que muchas plantas medicinales de primordial importancia para la atención de salud están desapareciendo debido a las prácticas de recolección inapropiadas o a la destrucción de su hábitat natural. ⁽¹⁷⁾

Existe una continua alteración y pérdida de cultivos indígenas que a menudo tienen la clave para hallar nuevas plantas medicinales con capacidad de beneficiar a la comunidad mundial y a las futuras generaciones. Es por eso que es necesario la aplicación de los métodos científicos modernos al cultivo, la selección, la fabricación y los ensayos clínicos de las hierbas medicinales es el medio más adecuado para transformar el comercio tradicional en la práctica industrial moderna. ^(4, 6, 18, 20)

Es conveniente agregar que en la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se instituyó una línea de investigación donde en un primer intento por desarrollar la efectividad medicinal de aquellas plantas que el recetario popular indica como efectivas para afecciones bucales, evaluó un total de 26 plantas, obteniendo a través de infusiones, el componente activo que se contrastó con microorganismos cariogénicos nativos, observando en muchas un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de estos y en otras ningún efecto.

Dentro de las plantas que demostraron un potencial inhibitorio se encontró el encino, y por ser este un árbol abundante y fácil de recolección se ha decidido darle seguimiento bajo estándares científicos más rigurosos y certeros. Así mismo estudios anteriores demostraron especies como *Q. peduncularis* son de las más efectivas, por lo tanto será tomado en cuenta para este estudio. ⁽¹⁸⁾

ENCINO (*QUERCUS PEDUNCULARIS*)

El Encino pertenece a la familia de las Fagáceas y al género *Quercus*. Se estiman aproximadamente 370 especies americanas, Muller reconoce 46 de Centro América, 28 descritas en Guatemala. ⁽²⁾

Los otros nombres con que es conocido el encino son: Bans, Chicharro, Col, Huite, Malcote, Pitán, Roble, Sical, Sunuj, Zinuh. ^(2,4)

La especie *Q. peduncularis*, es de tamaño medio, posee hojas gruesas, coriáceas, de 6 a 16 cm. de largo, obovadas o elípticas, ápice redondeado; tiene flores numerosas al final de un pedúnculo amarillo; es de fruto anual, solitario, subsésil o pedunculado, su copa es ancha de 15-18 mm; la bellota de 15 mm; es ovoide, pubescente, café oscuro de 1/3 incluido en la copa. ^(2,4)

Habita en planicies y colinas secas o húmedas con pinos de 900-3000 msnm, ha sido descrito en Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Jutiapa, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, y Zacapa.

Son árboles silvestres de lento crecimiento que puede recolectarse en cualquier momento, aunque se recomienda su manejo y reforestación a partir de almácigos producidos por semillas. ^(2,3)

A los árboles de este género se les usa indistintamente con fines medicinales. El cocimiento de corteza y hojas se usa para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastritis, tifoidea, vómitos), menstruaciones excesivas, mal de orín, anemia, resfrío y susto. ⁽²⁾

También puede utilizarse tópicamente para desinfectar heridas, granos con pus, y detener la sangre en heridas y hemorroides sangrantes; en gargarismos para desinfectar la garganta y amígdalas, fuego en la boca, dolor de muelas, y endurecer las encías, en lavados vaginales elimina la leucorrea.

Se le atribuye propiedad afrodisíaca, antiséptica, astringente, estimulante del SNC, diurética, hemostática, laxante, expectorante y tónica.

También se le da otros usos populares, ya que la madera es muy usada para hacer carbón, leña y pisos de madera; no es una buena madera para carpintería por ser dura y muchas veces irregular, la corteza también se usa para tamizar cueros y preparar tintas.

COMPOSICIÓN QUÍMICA

La corteza es rica en taninos. Los frutos contienen fécula como azúcares, grasas, taninos, y ácidos orgánicos. Las hojas contienen aceite esencial (0.5-1.0%), compuesto por Cineol, Pinenos, P-cinenos, Timol y Sesquiterpenos; Taninos (3-5%), Alcaloides (7%), Resina (6-14%), Goma (13.5%) y proteínas (15%).

Sobre la farmacognosia se sabe que la materia médica es la corteza seca. Se usan indistintamente las especies nativas como medicamento, asumiendo que tienen una composición y farmacología similar a las especies en Europa y Norte América, aunque no se ha demostrado que las especies nativas sean similares a las de otras latitudes.

Los principales componentes bioactivos del género son taninos y quercetina. La quercetina es un flavonoide ácido, soluble en etanol, activo contra bacterias y virus Herpes, Polio e Influenza.

A altas dosis puede ser purgante. La decocción de corteza administrada por vía oral en ratones en dosis de 1 a 5 g/kg no demostró toxicidad aguda; aunque la ceniza parece presentar cierta toxicidad.

Por su actividad tónica y estimulante del SNC está indicada para su uso oral en el tratamiento de Atonia Psicofísica y úlceras digestivas. Se recomienda administrar tres veces al día una dosis de 3-5 g/taza en decocción. 1-3 ml de la tintura, 1:10 en etanol 35%, 20-40 gotas del extracto fluido y 0.35-0.70 g/día del extracto seco.

Por su propiedad astringente, antiséptica y hemostática, está indicado su uso en el tratamiento tópico de amigdalitis, hemorroides, faringitis y leucorrea, aplicando una decocción de 2-6 g/taza o tintura 1:8 en etanol 35% diluida y aplicada en forma de lavados o gárgaras. ^(2, 3, 4)

En relación a la recolección del encino, las hojas se recolectan cuando las flores comienzan a abrirse. No deben recolectarse cuando están bañadas por el rocío o la lluvia. Deben desecharse si están descoloridas o atacadas por insectos o babosas. Las cortezas se recolectan generalmente tras un periodo húmedo, pues de esta forma se separan más fácilmente del leño. La duración del proceso de desecación varía desde unas pocas horas hasta muchas semanas. ^(1, 9)

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LA CORTEZA

El protocolo científico enfatiza en el método de extracción del principio activo de una planta, que debe seguirse paso a paso, en donde obtenida la muestra bajo las condiciones antes mencionadas, se procede a secar la corteza, siendo considerado el paso más importante para lograr un producto de óptima calidad, ya que de éste depende que el producto esté en condiciones de comercializarse, consumirse y conservarse por períodos prolongados. La corteza posee un porcentaje de humedad de 80-90%, así como un peso seco de 300-400g y debe de tener una pérdida de 60-70%.⁽²⁾

Una vez llevado a cabo este proceso, se continúa con la extracción por percolación, o bien llevada a cabo por un cono de decantación, este paso, consiste en hacer pasar el disolvente a través de la droga vegetal hasta su extracción completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la droga con el disolvente siempre renovado.

En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo de solvente. (Ver anexo no.3)

Luego del proceso de percolación, la solución obtenida puede utilizarse para producir extractos o tinturas. Para preparar los primeros, el líquido obtenido, que se le llama menstuo, se concentra en rotavapor o un equipo similar y se repite la operación hasta que se agote la droga con el disolvente recuperado.

El uso del rotavapor o también conocido como evaporador rotatorio, es un equipo de laboratorio utilizado para obtener extractos de una droga vegetal, y lo que obtenemos es la concentración, la cual representa la etapa siguiente al proceso de extracción.

Este equipo funciona en base a los siguientes principios:

1. Se coloca la muestra en un balón de evaporación a 40°C que rota a una velocidad constante produciendo una película que aumenta la superficie de evaporación.

2. Con la ayuda de una bomba se genera un vacío entre 30 y 300 mbar que facilita la evaporación sin necesidad de aumentar la temperatura.
3. El vapor del disolvente es condensado en el refrigerante que está conectado a un sistema de enfriamiento que luego se colecta en un balón colector.

Ya obtenida la concentración, se utiliza de acuerdo a la investigación o proceso que se lleve a cabo. ^{(Ver}
anexo no. 4)

VI. OBJETIVOS

GENERAL

Comprobación del efecto inhibitorio en el crecimiento de microorganismos cariogénicos, de la corteza de encino extraído con el método de rotavapor.

ESPECIFICOS

Determinar el efecto inhibitorio del extracto de corteza en el crecimiento del número de colonias de *S. mutans* en base a crecimiento completo, parcialmente completo, intermedio, parcialmente limitado o limitado.

Determinar el efecto inhibitorio del extracto de corteza en el crecimiento de *S. mutans* alrededor de los discos de difusión en base a resistente, parcialmente resistente, intermedio, parcialmente sensible o sensible.

Establecer el efecto inhibitorio del extracto de corteza en el crecimiento del número de colonias de *L. acidophilus* en base a su crecimiento completo, parcialmente completo, intermedio, parcialmente limitado o limitado.

Establecer el efecto inhibitorio del extracto de corteza en el crecimiento de *L. acidophilus* alrededor de los discos de difusión en base a resistente, parcialmente resistente, intermedio, parcialmente sensible o sensible.

VII. HIPOTESIS

HIPÓTESIS NULA

El efecto del extracto de corteza de encino con rotavapor, no será de inhibición en el crecimiento de los microorganismos cariogénicos.

HIPÓTESIS ALTERNA

El efecto del extracto de corteza de encino con rotavapor, será de inhibición en el crecimiento de los microorganismos cariogénicos.

VIII. VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

Concentración del extracto con el método de rotavapor de la corteza de árbol de encino (*Q. peduncularis*).

VARIABLES DEPENDIENTES

Inhibición en el crecimiento del microorganismo *S. mutans* en agar planta, in vitro.

Inhibición en el crecimiento del microorganismo *S. mutans* con discos de difusión, in vitro.

Inhibición en el crecimiento del microorganismo *L. acidophilus* en agar planta, in vitro.

Inhibición en el crecimiento del microorganismo *L. acidophilus* con discos de difusión, in vitro.

DEFINICIÓN E INDICADORES DE LAS VARIABLES

1. Concentración del extracto

Producto en el que se ha hecho desaparecer el agua, obteniendo el contenido puro de la planta en estudio.

Indicadores

Seguido de la utilización del rotavapor, obtener un determinado contenido de residuo seco, de extractos purificados en consistencia sólida y cristalizada.

2. Inhibición en el crecimiento de microorganismos en agar planta para *S. mutans*

Reducción en el crecimiento del número de colonias observadas del microorganismo, en su medio de cultivo selectivo, siendo para el *S. mutans* el medio Mitis Salivarius y Müller Hinton, que ha sido previamente adicionado con el extracto en estudio.

Indicadores

Observación del número de colonias formadas en las distintas azadas, en el medio de cultivo clasificándolas en crecimiento completo, parcialmente completo, intermedio, parcialmente limitado o limitado.

3. Inhibición en el crecimiento de microorganismos con discos de difusión para *S. mutans*

Consiste en un disco de papel fieltro que contiene una dosis de fármaco o extracto en estudio, colocándolo en la superficie de un medio sólido que ha sido previamente inoculado con el organismo a prueba; en donde para el *S. mutans* consiste en los medios Mitis Salivarius y Müller Hinton.

Indicadores

Medición de la distancia del halo de inhibición de crecimiento microbiano en milímetros, formada alrededor del disco de papel fieltro, clasificándola como:

Resistente: < 10 mm

Parcialmente resistente: 11 a 12 mm

Intermedio: 13 a 14 mm

Parcialmente sensible: 15 a 17 mm

Sensible: > 17 mm

4. Inhibición en el crecimiento de microorganismos en agar planta para *L. acidophilus*

Reducción en el crecimiento del número de colonias observadas del microorganismo, en su medio de cultivo selectivo, siendo para el *L. acidophilus* el medio Agar Rogosa y Müller Hinton, que ha sido previamente adicionado con el extracto en estudio.

Indicadores

Observación del número de colonias formadas en las distintas azadas, en el medio de cultivo clasificándolas en crecimiento completo, parcialmente completo, intermedio, parcialmente limitado o limitado.

5. Inhibición en el crecimiento de microorganismos con discos de difusión para *L. acidophilus*

Consiste en un disco de papel fieltro que contiene una dosis de fármaco o extracto en estudio, colocándolo en la superficie de un medio sólido que ha sido previamente inoculado con el organismo a prueba; en donde para el *L. acidophilus* consiste en los medios Agar Rogosa y Müller Hinton.

Indicadores

Medición de la distancia del halo de inhibición de crecimiento microbiano en milímetros, formada alrededor del disco de papel fieltro, clasificándola como:

Resistente: < 10 mm

Parcialmente resistente: 11 a 12 mm

Intermedio: 13 a 14 mm

Parcialmente sensible: 15 a 17 mm

Sensible: > 17 mm

IX. METODOLOGÍA

1. Recolección, percolación y concentración del extracto de la planta

Se utilizó la corteza de una especie de encino, conocida con el nombre de *Quercus Peduncularis*, la cual fue recolectada una muestra y llevada a la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, específicamente al herbario de dicha facultad, para su reconocimiento y clasificación. ^(Ver anexo no. 1)

Una vez clasificada la planta, se buscó obtener aproximadamente 1 libra de corteza. Seguidamente se procedió a procesarla desecándola, a una temperatura de 63⁰ C por un periodo de 24 horas, con un deshidratador casero para asegurar la eliminación de la mayor cantidad de humedad que pudiera contener y evitar la proliferación de hongos. Luego se procedió a macerarla y pulverizarla.

Se pesó esa corteza pulverizada para obtener un peso de 150 gramos, y se utilizó el método de destilado por proceso etanólico en donde se utiliza un cono de decantación colocado en un soporte de anillo, se colocó la planta desecada y un filtro, se puso 150 g. de planta y 1000 ml de alcohol etanol al 70%, se dejó por 72 horas; todo esto se filtró y se obtuvo un producto en estado líquido.

Lo que obtuvimos del destilado se utilizó en el rotavapor, para lo cual se buscó el concentrado de todo el extracto en donde se obtuvo un contenido puro, o el principio activo de interés de la planta en estudio. Se colocó el producto obtenido del destilado en un balón por encima de la olla que contiene agua destilada, se llevó a una temperatura de 20⁰ C y a una velocidad de rotación de 3.

Cuando se obtuvo ese producto separado del rotavapor, se procedió a vaciar el contenido en una campana para su desecado, dejándose por 48 horas. Se buscó obtener una consistencia solidificada y cristalizada.

Se procedió a conseguir la concentración de la planta, la cual fue la adecuada para la realización de los medios de cultivo, y se utilizó una proporción de 10 mg de extracto, y 1 ml de alcohol etanol al 50%. Esta concentración fue la que se añadió a los medios de cultivo, así como a los discos de difusión.

2. Preparación de medios de cultivo

Seguidamente se procedió a preparar los medios de cultivos selectivos, siendo estos Mitis Salivarius para el *S. mutans*, el Agar Rogosa para *L. acidophilus* y el Müeller Hinton como medio enriquecido para ambos microorganismos. Para su fabricación se colocó la proporción de cada medio:

- Mitis Salivarius se utilizó 15 g. del medio con 300 ml de agua destilada, ya que a este medio se le adicionó 5% de sacarosa, para proveer el sustrato necesario para las bacterias.
- Agar Rogosa se utilizó 13.64 g. de medio con 200 ml de agua destilada, adicionando a este medio ácido acético como sustrato para las bacterias.
- Müeller Hinton se utilizó 7.6 g de medio con 200 ml de agua destilada.

Una vez realizado esto, se utilizó el aparato de laboratorio Vortex para un correcto mezclado del medio, seguidamente se hirvió cada medio de cultivo, y se esterilizó, a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

3. Preparación de cepas estandarizadas ATCC®

Para este estudio se utilizaron cepas estandarizadas ATCC®, siendo las siguientes *S. mutans* y *L. acidophilus* dado que son los microorganismos de mayor papel en el proceso de caries dental.

Para asegurar las siembras de las bacterias, se utilizó el standard de Mcfarland, en donde se colocó tubos de ensayo con suero fisiológico a 3 ml. Y con el asa de henle se tomó una colonia de bacterias en estudio, y se disolvió hasta alcanzar el índice de turbidez que nos proporciona el standard de Mcfarland al 0.5%, lo cual equivale a 100,000 UFC. Dichos tubos se llevaron a incubar por 2 horas, y de allí se tomó las muestras para los cultivos en ambas metodologías.

Se procedió a cultivar los microorganismos de las cepas ATCC® en sus respectivos medios de cultivos selectivos, para obtener un total de ocho cajas de petri distribuidas de la siguiente forma:

- 2 cajas de petri para el microorganismo *S. mutans*, con el medio de cultivo Mitis Salivarius.
- 1 caja de petri para el microorganismo *S. mutans*, con el medio de cultivo Müeller Hinton.

- 1 caja de petri para el microorganismo *S. mutans*, con el medio de cultivo Mitis Salivarius como grupo control.
- 2 cajas de petri para el microorganismo *L. acidophilus*, con el medio de cultivo Agar Rogosa.
- 1 caja de petri para el microorganismo *L. acidophilus*, con el medio Müller Hinton.
- 1 caja de petri para el microorganismo *L. acidophilus*, con el medio de cultivo Agar Rogosa como grupo control.

Estos medios de cultivos fueron utilizados para la metodología de técnica de difusión de disco colocado en las cajas de petri, dichos discos se encontraban estériles; se les adicionó la concentración del extracto de la planta, la cual consistía en 10 mg/ml, utilizando para ello una pipeta automática. Se colocó cuatro discos en cada caja de petri, dando un total de 32 discos de difusión. Los discos colocados en las cajas de petri como grupo control no se les adicionó la concentración del extracto, siendo 4 discos para el *S. mutans* y 4 discos para el *L. acidophilus*.

Para esta metodología de discos de difusión, se utilizó el análisis estadístico de Kruskal-Wallis, en donde es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población, y es utilizada para 3 grupos o más, comparándolos entre sí. Para la comparación de los datos y la obtención de los resultados de esta prueba se utilizó el software Kwikstat 4.1.

La otra técnica utilizada para determinar el efecto inhibitorio de la planta, fue por medio de los Agar Planta, que son los mismos medios de cultivos selectivos, pero con la concentración del extracto de la planta, siempre a 10 mg/ml, en donde se cultivó los microorganismos por azadas. En esta metodología se prepararon dos grupos control para cada medio selectivo, en donde no se les adicionó la concentración del extracto y cuatro grupos de estudio respectivamente, quedando distribuidos de la siguiente manera:

- 1 caja de petri con el medio Mitis Salivarius para *S. mutans*, realizando 4 azadas, como grupo de estudio.
- 1 caja de petri con el medio Müller Hinton para *S. mutans*, realizando 4 azadas, como grupo de estudio.
- 1 caja de petri con el medio Mitis Salivarius para *S. mutans*, realizando 4 azadas, como grupo control.

- 1 caja de petri con el medio Müeller Hinton para *S. mutans*, realizando 4 azadas como grupo control.
- 1 caja de petri con el medio Agar Rogosa para *L. acidophilus*, realizando 4 azadas como grupo de estudio.
- 1 caja de petri con el medio Müeller Hinton para *L. acidophilus*, realizando 4 azadas como grupo de estudio.
- 1 caja de petri con el medio Agar Rogosa para *L. acidophilus*, realizando 4 azadas como grupo control.
- 1 caja de petri con el medio Müeller Hinton para *L. acidophilus*, realizando 4 azadas como grupo control.

De tal manera se obtuvo un total de ocho cajas de petri, realizando en cada una de ellas 4 azadas, dando un total de 32 azadas para esta metodología.

Para ambas metodologías, se procedió a incubarlos por 48 horas, luego se dejaron 24 horas más a temperatura ambiente, seguido de eso, se evaluaron los resultados de crecimiento de ambos grupos de microorganismos, para su contrastación y comparación entre un grupo y otro. Se realizó el análisis de resultados correspondiente.

4. Coloración de Gram

Así mismo se realizó la coloración de gram, para ambas cepas de microorganismos, para otorgar mayor respaldo al estudio, y presentar aún más confiabilidad de que las bacterias estudiadas son las indicadas, a pesar de ser cepas estandarizadas.

Se procedió a tomar una muestra bacteriana de cada cepa en estudio, y se colocó una gota de suero fisiológico en un portaobjetos, se llevó encima del mechero para su fijación y seguidamente se incubo por un período de dos horas, luego se les aplicó las tinturas de gram y se llevó al microscopio de luz para su observación y determinación, examinando su morfología bacteriana.

5. Pruebas bioquímicas de sorbitol y manitol

De igual forma, se llevó a cabo el procedimiento de pruebas bioquímicas, para ambas cepas de microorganismos, las cuales consistieron en sorbitol y manitol, estas pruebas se prepararon al 5%, colocando 2.5 g y 50 ml de agua desmineralizada, se llevó a esterilizar, luego se colocó en la incubadora por 24 horas y se determinó el nivel de turbidez.

X. RECURSOS DE INVESTIGACIÓN

RECURSOS HUMANOS

- Licenciado Químico.
- Dos técnicas de laboratorio.

RECURSOS FÍSICOS

- Instalaciones del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, edificio M1.

EQUIPO

- Un rotavapor (marca Buchi).
- Campana para las inoculaciones de microorganismos en medios de cultivo.
- Bomba de vacío (marca Buchi).
- Enfriador de agua (marca Lauda).
- Incinerador.
- Microscopios.
- Tubos de decantación.
- Deshidratador casero (marca NESCO).
- Esterilizador.
- Vortex (para mezcla de medios de cultivos).

MATERIALES

- Reactivos.
- Medios de cultivo (Agar Mitis Salivarius, Agar Rogosa y Müller Hinton).
- Cepas estandarizadas ATCC® (*S. mutans* y *L. acidophilus*).
- Agua desmineralizada.
- Planta objeto de estudio (*Q. peduncularis*).
- Sacarosa, sorbitol y manitol.
- Portaobjetos.

INSUMOS MENORES

- Recipientes plásticos.
- Cajas de petri.
- Asa.
- Algodones.
- Discos de papel estériles.
- Pinzas.
- Guantes desechables.
- Desinfectantes.
- Papel mayordomo.
- Mascarillas.
- Tubos de ensayo.
- Servilletas.

XI. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Se presenta los resultados obtenidos en el trabajo de campo realizado para esta investigación, en donde se llevó a cabo pruebas in vitro del efecto inhibitorio de la corteza de encino sobre microorganismos cariogénicos *S. mutans* y *L. acidophilus*. A pesar que se utilizó cepas estandarizadas para este estudio, se llevó a cabo pruebas de coloración de gram y pruebas bioquímicas de azúcares para obtener mayor respaldo y confiabilidad en los resultados obtenidos, de los cuales se muestran a continuación.

- **Resultados de coloración de gram para ambos microorganismos**

En relación a la coloración de gram, se observó que los microorganismos *S. mutans*, los cuales crecieron en los medios de cultivo donde fue adicionado el extracto, presentaron una morfología de cadenas de cocos, como es habitual en ellos, sin embargo se observó reducido el número de cocos por cadena, siendo cadenas más cortas, en la observación al microscopio de luz.

Los microorganismos *L. acidophilus*, los cuales fueron tomados de igual manera de medios de cultivo con el extracto adicionado, en la coloración de gram, se observaron al microscopio, y se examinó la morfología, presentando la característica de los bacilos, la cual es alargada, pero sí en menor número.

Es por ello, que para ambos microorganismos se concluye y confirma que son bacterias gram positivas, lo cual era lo esperado por ser cepas estandarizadas.

- **Resultados de pruebas bioquímicas para ambas cepas microbianas**

Con relación a la prueba bioquímica o serológica para ambas cepas bacterianas, las cuales fueron sometidas a los azúcares sorbitol y manitol; presentaron un resultado positivo de turbidez generalizada para ambas pruebas, así como para ambos microorganismos; lo cual se interpreta que las bacterias están activas y producen una fermentación positiva del azúcar. ^(Ver cuadro no.1)

Cuadro no. 1

Pruebas bioquímicas de azúcares sorbitol y manitol, realizadas a los microorganismos cariogénicos *S. mutans* y *L. acidophilus*, in vitro

NO.	CEPAS ATCC	PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
1	<i>S. mutans</i>	Sorbitol	Turbidez positiva
2	<i>S. mutans</i>	Manitol	Turbidez positiva
3	<i>L. acidophilus</i>	Sorbitol	Turbidez positiva
4	<i>L. acidophilus</i>	Manitol	Turbidez positiva

Fuente: Elaboración propia con datos del trabajo de campo.

Seguidamente de la presentación de esas pruebas, se muestra las siguientes metodologías utilizadas para el ensayo y verificar el efecto inhibitorio de la corteza de encino, sobre los microorganismos cariogénicos.

- **Resultados de metodología de siembras por azadas**

En la metodología de siembra por azadas, se realizó en ocho cajas de petri, distribuidas de la siguiente manera:

Para el *S. mutans* se utilizó 4 cajas de petri:

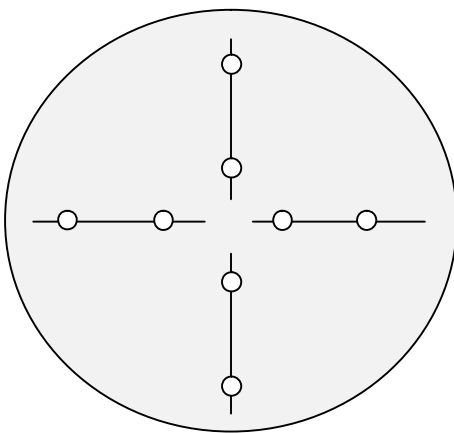
- 1 caja con Mitis Salivarius } como grupo experimental, con el extracto de corteza,
- 1 caja con Mueller Hinton } realizando 4 siembras de azadas por cada caja.
- 1 caja con Mitis Salivarius } como grupo control, sin el extracto de corteza,
- 1 caja con Mueller Hinton } realizando 4 siembras de azadas por cada caja.

Esto da un total de 4 cajas de petri, en donde se realizaron 4 azadas por cada caja, para dar un total de 16 azadas solamente para el *S. mutans*, se observaron los resultados en cada azada.

El patrón de crecimiento que presentó los medios de cultivo, Mitis Salivarius y el Müller Hinton de los grupos experimentales para el *S. mutans*, mostró un crecimiento intermedio a lo largo de la azada con aspecto de colonias en las áreas de siembra, en las 8 azadas llevadas a cabo en los grupos experimentales presentó un crecimiento intermedio, es decir, que no hubo un crecimiento completo en la caja de petri, así como tampoco un crecimiento limitado. (Ver figura no.1)

Figura no. 1

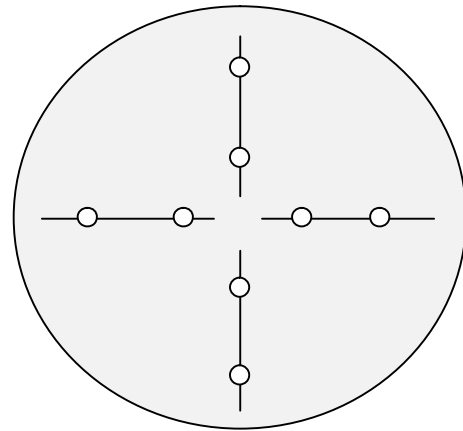
Patrón de crecimiento de microorganismo *S. mutans*, con siembra por azadas en los medios de cultivo selectivo con el extracto de la corteza de encino en los grupos experimentales, in vitro.



Grupo experimental

Mitis Salivarius

Crecimiento intermedio



Grupo experimental

Müller Hinton

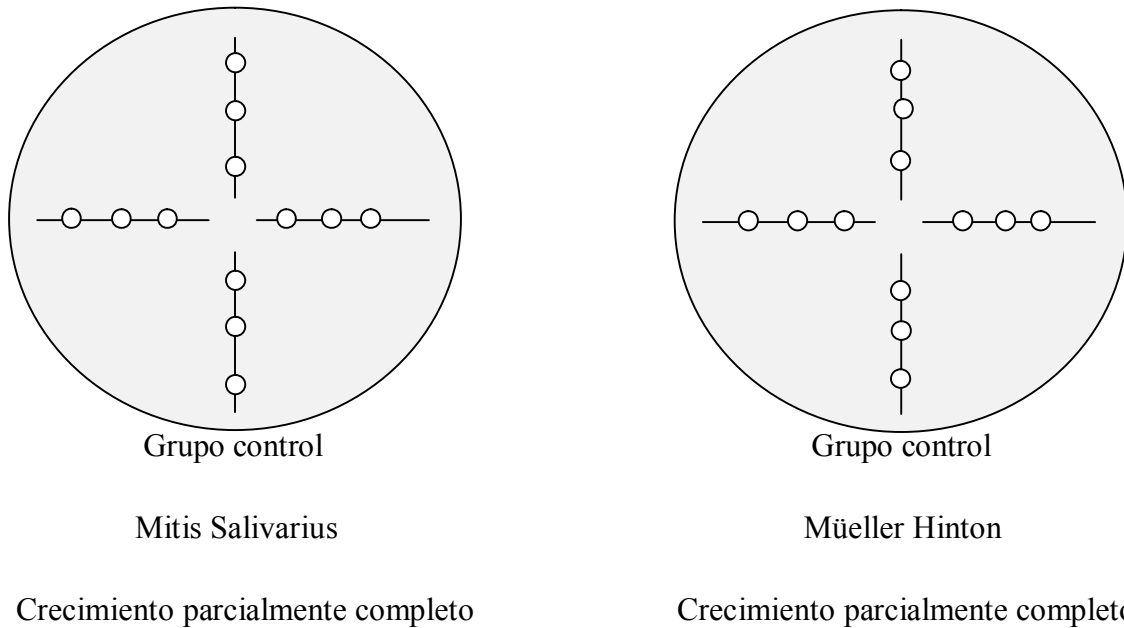
Crecimiento intermedio

Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

En el grupo control para *S. mutans* en donde se utilizó los medios Mitis Salivarius y Müller Hinton, se presentó un crecimiento parcialmente completo, en las 8 azadas realizadas, esto debido a que no se le adicionó el extracto al medio de cultivo. (Ver figura no. 2)

Figura no. 2

Patrón de crecimiento de microorganismo *S. mutans*, con siembra por azadas en los medios de cultivo selectivo sin el extracto de la corteza de encino en los grupos controles, in vitro.



Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

En resumen, de las 16 azadas realizadas para el *S. mutans* en la metodología de siembra por azadas, 8 azadas presentaron crecimiento intermedio para los grupos experimentales, mientras 8 azadas presentaron crecimiento parcialmente completo, en los grupos control. (Ver cuadro no. 2)

Cuadro no. 2

Patrón de crecimiento por categoría del microorganismo *S. mutans*, con la metodología de siembra por azadas, en los grupos experimentales en comparación con los grupos control, in vitro.

CATEGORIA DE CRECIMIENTO	GRUPOS EXPERIMENTALES		GRUPOS CONTROL	
	Mitis Salivarius Número de azadas por caja	Müeller Hinton Número de azadas por caja	Mitis Salivarius Número de azadas por caja	Müeller Hinton Número de azadas por caja
Parcialmente completo	0	0	4	4
Intermedio	4	4	0	0
Totales	4	4	4	4

Fuente: Elaboración propia con datos del trabajo de campo.

Para el *L. acidophilus* se utilizó 4 cajas de petri:

1 caja con Agar Rogosa } como grupo experimental, con el extracto de corteza,
1 caja con Müller Hinton } realizando 4 siembras de azadas por cada caja.

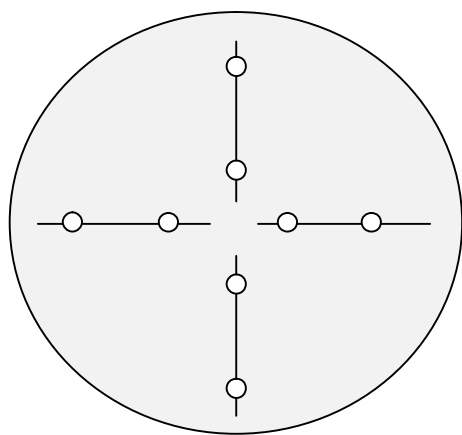
1 caja con Agar Rogosa } como grupo control, sin el extracto de corteza,
1 caja con Müller Hinton } realizando 4 siembras de azadas por cada caja.

Esto da un total de 4 cajas de petri, en donde se realizaron 4 azadas por cada caja, para dar un total de 16 azadas solamente para el *L. acidophilus*, se observaron los resultados en cada azada.

En los medios de cultivo utilizados para el microorganismo *L. acidophilus*, que son Agar Rogosa y Müller Hinton, el patrón de crecimiento que mostró fue de igual manera un crecimiento intermedio a lo largo de la azada; en las 8 azadas llevadas a cabo en los grupos experimentales hubo un crecimiento intermedio, de la misma manera que para el otro microorganismo. (Ver figura no.3)

Figura no. 3

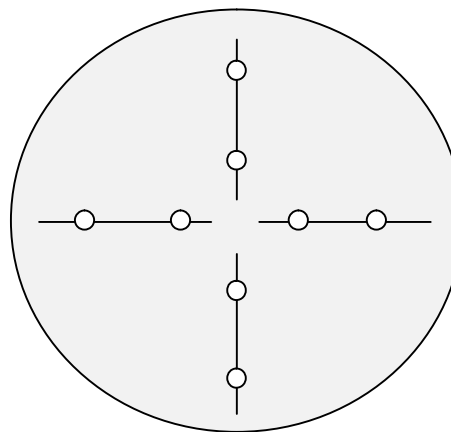
Patrón de crecimiento de microorganismo *L. acidophilus*, con siembra por azadas en los medios de cultivo selectivo con el extracto de la corteza de encino en los grupos experimentales, in vitro.



Grupo experimental

Agar Rogosa

Crecimiento intermedio



Grupo experimental

Müller Hinton

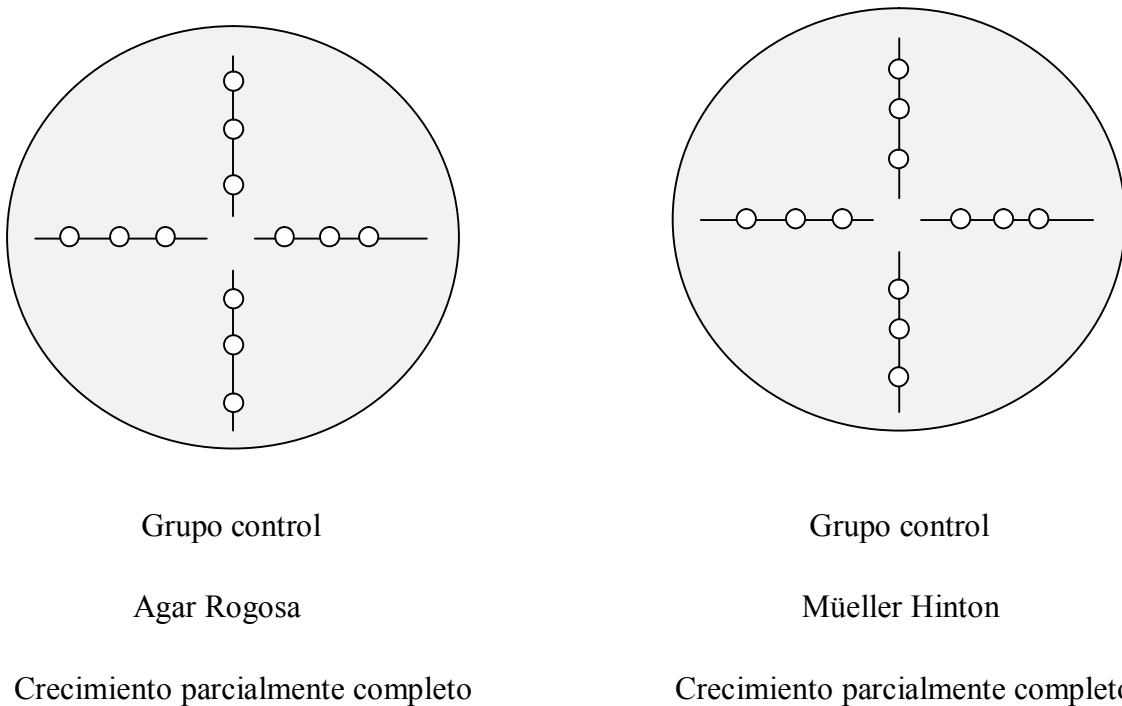
Crecimiento intermedio

Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

De la misma manera, se obtuvieron los resultados para el *L. acidophilus* en su grupo control, en cada medio de cultivo, siendo Agar Rogosa y Müeller Hinton, presentando un crecimiento parcialmente completo, en las 8 azadas realizadas en cada medio, ya que también no poseía adicionado el extracto. (Ver figura no.4)

Figura no. 4

Patrón de crecimiento de microorganismo *L. acidophilus*, con siembra por azadas en los medios de cultivo selectivo sin el extracto de la corteza de encino en los grupos controles, in vitro.



Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

En las figuras de la no. 1 a la no. 4, los círculos grandes corresponden a las cajas de petri, las líneas trazadas en cruz dentro de la caja de petri, corresponde a las siembras por azadas, y los círculos pequeños encima de las líneas de azadas, corresponde al crecimiento de colonias.

En resumen, de las 16 azadas realizadas para el *L. acidophilus*, en la metodología de siembra por azadas, 8 azadas presentaron crecimiento intermedio para los grupos experimentales, mientras 8 azadas presentaron crecimiento parcialmente completo, en los grupos control. (Ver cuadro no. 3)

Cuadro no. 3

Patrón de crecimiento por categoría del microorganismo *L. acidophilus*, con la metodología de siembra por azadas, en los grupos experimentales en comparación con los grupos control, in vitro.

CATEGORIA DE CRECIMIENTO	GRUPOS DE ESTUDIO		GRUPOS CONTROL	
	Agar Rogosa Número de azadas por caja	Müeller Hinton Número de azadas por caja	Agar Rogosa Número de azadas por caja	Müeller Hinton Número de azadas por caja
Parcialmente completo	0	0	4	4
Intermedio	4	4	0	0
Totales	4	4	4	4

Fuente: Elaboración propia con datos del trabajo de campo.

Es así como en la metodología de siembra por azadas, se sometió a observación 32 azadas, presentando 16 azadas con un crecimiento intermedio en los grupos de estudio, y 16 con un crecimiento parcialmente completo en los grupos control.

- **Resultados de metodología de discos de difusión**

En base a la metodología de los discos de difusión, se realizó en 8 cajas de petri, distribuidas de la siguiente manera:

Para el *S. mutans* se utilizó 4 cajas de petri:

2 cajas con Mitis Salivarius	}	como grupo experimental, con el extracto de corteza
1 caja con Müeller Hinton		colocando 4 discos por caja
1 caja con Mitis Salivarius	}	Como grupo control, sin el extracto de corteza
		colocando 4 discos por caja

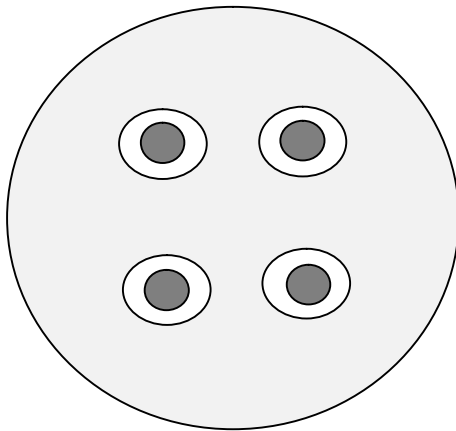
Esto da un total de 4 cajas de petri, en donde se colocaron 4 discos por cada caja, para dar un total de 16 discos de difusión solamente para el *S. mutans*, se observaron los resultados en cada disco.

Los resultados obtenidos para el microorganismo *S. mutans*, para el medio de cultivo selectivo Mitis Salivarius, que contenía los discos con el extracto de la corteza, presentó un rango de crecimiento en donde se clasifica parcialmente sensible, el cual corresponde de 15 – 16 mm de halo de inhibición, para 7 de los 8 discos sometidos a prueba; solamente 1 disco presentó 13 – 14 mm de halo de inhibición encasillándose en el rango de intermedio. (Ver cuadro no.4) (Ver figura no.5)

En el medio de cultivo enriquecido Müller Hinton, que contenía los discos con el extracto de la corteza, presentó un crecimiento intermedio, resultado correspondiente a 13 – 14 mm de halo de inhibición, para los 4 discos incluidos en este medio. (Ver cuadro no.4) (Ver figura no.5)

Figura no. 5

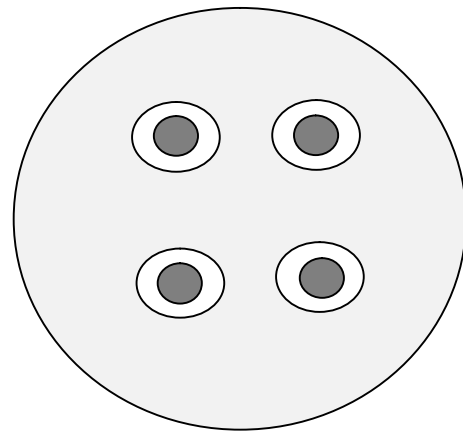
Patrón de crecimiento de microorganismo *S. mutans*, en discos de difusión con el extracto de la corteza de encino en los medios de cultivo selectivo de los grupos experimentales, in vitro.



Grupo experimental

2 Mitis Salivarius

Crecimiento parcialmente sensible



Grupo experimental

1 Müller Hinton

Crecimiento intermedio

Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

Como se observa en la figura no. 5, se encuentran los grupos experimentales, siendo 2 cajas de petri para el Mitis Salivarius y 1 caja de petri para el Müller Hinton; los círculos grises representan a los discos de difusión que contienen el extracto de corteza, y los círculos blancos representan el halo de inhibición presentado por cada disco.

Cuadro no. 4

Patrón de crecimiento por categoría del microorganismo *S. mutans*, con la metodología de discos de difusión con el extracto de la corteza, con su medición de los halos de inhibición en milímetros de los grupos experimentales, in vitro.

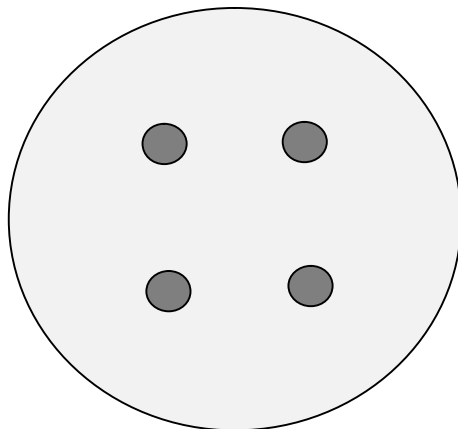
Categoría de crecimiento	Halo de inhibición mm	Mitis Salivarius	Mitis Salivarius	Müller Hinton
Intermedio	13 - 14 mm	1	0	4
Parcialmente sensible	15 - 16 mm	3	4	0
Totales		4	4	4

Fuente: Elaboración propia con datos del trabajo de campo.

Para el grupo control, en donde se utilizó el medio de cultivo selectivo Mitis Salivarius, en donde los discos se colocaron estériles, es decir, sin el extracto de la corteza, presentó 0 mm de inhibición en los cuatro discos utilizados, como era esperado. (Ver figura no.6)

Figura no. 6

Patrón de crecimiento de microorganismo *S. mutans*, en discos de difusión sin el extracto de la corteza de encino en el medio de cultivo selectivo del grupo control, in vitro.



Grupo control

Mitis Salivarius

Crecimiento Resistente

Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

Para el *L. acidophilus* se utilizó 4 cajas de petri:

2 cajas con Agar Rogosa	}	como grupo experimental, con el extracto de corteza
1 caja con Müller Hinton		colocando 4 discos por caja
1 caja con Agar Rogosa	}	Como grupo control, sin el extracto de corteza
		colocando 4 discos por caja

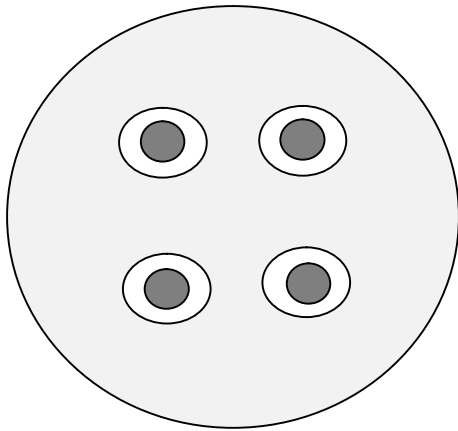
Esto da un total de 4 cajas de petri, en donde se colocaron 4 discos por cada caja, para dar un total de 16 discos de difusión solamente para el *L. acidophilus*, se observaron los resultados en cada disco.

Los resultados obtenidos para el microorganismo *L. acidophilus*, para el medio de cultivo selectivo Agar Rogosa, que contenía los discos con el extracto de la corteza, presentó un rango de crecimiento en donde se clasifica parcialmente sensible, el cual corresponde de 15 – 16 mm de halo de inhibición, para 6 de los 8 discos sometidos a prueba; los otros 2 discos presentaron 13 – 14 mm de halo de inhibición encasillándose en el rango de intermedio. (Ver cuadro no.5) (Ver figura no.7)

Para el medio de cultivo enriquecido Müller Hinton, presentó un crecimiento similar al de Agar Rogosa, que contenía los discos con el extracto de la corteza, en donde 3 de los 4 discos, se clasificaron en parcialmente sensible correspondiente a 15 -16 mm de halo de inhibición, y solamente 1 disco se reportó en la clasificación de intermedio correspondiente a 13 -14 mm de halo de inhibición. (Ver cuadro no.5) (Ver figura no.7)

Figura no. 7

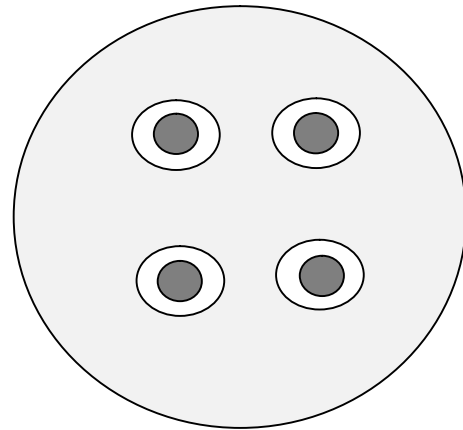
Patrón de crecimiento de microorganismo *L. acidophilus*, en discos de difusión con el extracto de la corteza de encino en los medios de cultivo selectivo de los grupos experimentales, in vitro.



Grupo experimental

2 Agar Rogosa

Crecimiento parcialmente sensible



Grupo experimental

1 Mueller Hinton

Crecimiento parcialmente sensible

Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

Como se observa en la figura no. 7, se encuentran los grupos experimentales, siendo 2 cajas de petri para el Agar Rogosa y 1 caja de petri para el Mueller Hinton; los círculos grises representan a los discos de difusión que contienen el extracto de corteza, y los círculos blancos representan el halo de inhibición presentado por cada disco.

Cuadro no. 5

Patrón de crecimiento por categoría del microorganismo *L. acidophilus*, con la metodología de discos de difusión con el extracto de la corteza, con su medición de los halos de inhibición en milímetros de los grupos experimentales, in vitro.

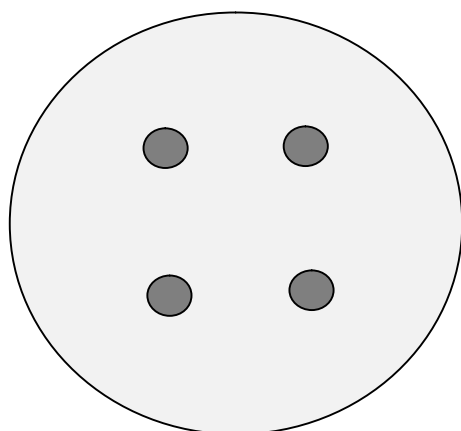
Categoría de crecimiento	Halo de inhibición mm	Agar Rogosa	Agar Rogosa	Müeller Hinton
Intermedio	13 - 14 mm	1	1	1
Parcialmente sensible	15 - 16 mm	3	3	3
Totales		4	4	4

Fuente: Elaboración propia con datos del trabajo de campo.

Para el grupo control, se utilizó el medio selectivo Agar Rogosa con discos estériles, es decir, sin el extracto de la corteza, en donde reportó 0 mm de halo de inhibición en los 4 discos utilizados. (Ver figura no.8)

Figura no. 8

Patrón de crecimiento de microorganismo *L. acidophilus*, en discos de difusión sin el extracto de la corteza de encino en el medio de cultivo selectivo del grupo control, in vitro.



Grupo control

Agar Rogosa

Crecimiento Resistente

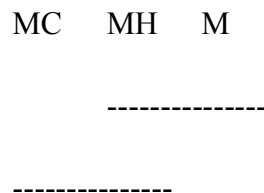
Fuente: Observación propia con datos del trabajo de campo.

Como se mencionó en la metodología, el análisis estadístico fue por medio de la prueba Kruskal-Wallis, comparando a los tres grupos para el microorganismo *S. mutans*, es decir, la comparación entre los grupos Mitis Salivarius, Müeller Hinton, y el grupo control.

La población para el grupo de Mitis Salivarius fue de 8, y su rango de 98.0; la población para el grupo de Müeller Hinton fue de 4 y su rango de 28.0; para el grupo control fue su población de 4 y su rango de 10.0. Se utilizó el test de comparación múltiple de Tukey, en donde se obtuvo el resultado siguiente:

- El grupo Mitis Salivarius posee homogeneidad con el grupo Müeller Hinton, pero presentó diferencia en comparación con el grupo control.

Para presentarlo de una forma gráfica, sería de la siguiente manera, en donde el grupo Mitis Salivarius es M; el Müeller Hinton es MH; y el grupo control es MC, lo cual significa que cualquiera de dos grupos que estén marcados por la misma línea no poseen diferencia significativa.



Esta representación gráfica posee un nivel de significancia de 0.05, por lo que se concluye que sí existe diferencia estadística significativa entre los dos grupos de estudio, en comparación del grupo control; por lo se apoya la hipótesis alterna, en donde el efecto del extracto de la corteza de encino, es de inhibición en el crecimiento del microorganismo *S. mutans*, interpretando que su efecto es bacteriostático. ^(2, 3, 14, 19)

De igual manera se trabajó el análisis para el microorganismo *L. acidophilus*, y la clasificación para ambos grupos de estudio, Agar Rogosa y Müeller Hinton, es de parcialmente sensible; así como en el grupo control como la clasificación de resistente.

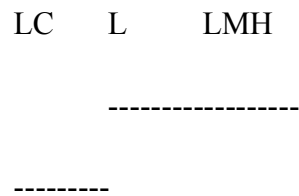
Se trabajó con el mismo análisis estadístico para este microorganismo, en donde se comparó el crecimiento y comportamiento en los tres grupos, siendo el Agar Rogosa como L; el Müeller Hinton como LMH, y el grupo control como LC.

El grupo de Agar Rogosa posee una población de 8 y su rango de 84.0; el grupo de Müller Hinton con una población de 4 y su rango de 42.0; y el grupo control con una población de 4 y su rango de 10.0.

Se utilizó el test de comparación múltiple de Tukey, en donde se obtuvo el resultado siguiente:

- El grupo Agar Rogosa posee homogeneidad con el grupo Müller Hinton, pero presentó diferencia total en comparación con el grupo control.

Para presentarlo de una forma gráfica estaría de la siguiente manera, lo cual significa que cualquiera de dos grupos que estén marcados por la misma línea no poseen diferencia significativa.



De igual forma esta representación gráfica posee un nivel de significancia de 0.05, por lo que se concluye que sí existe diferencia estadística significativa entre los dos grupos de estudio, en comparación del grupo control; por lo se apoya la hipótesis alterna, en donde el efecto del extracto de la corteza de encino, es de inhibición en el crecimiento del microorganismo *L. acidophilus*, interpretando que su efecto es bacteriostático. ^(2, 3, 14, 19)

XII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En base a esta investigación, los resultados obtenidos respaldan a estudios anteriores que reportan una inhibición en el crecimiento de los microorganismos cariogénicos *S. mutans* y *L. acidophilus*, al añadirles el extracto de la corteza de encino. ^(6, 18, 19) En esta investigación se observó que utilizando dos metodologías completamente diferentes, se obtuvo resultados bastante similares, en relación al efecto inhibitorio de la corteza de la planta *Q. peduncularis*, en los medios de cultivo para microorganismos cariogénicos *S. mutans* y *L. acidophilus*, in vitro.

Sin embargo, en el proceso de investigación se determinaron limitantes que influyeron en los resultados obtenidos en este estudio, como lo es la carencia de algún componente que cumpliera con el efecto de alteración física, para poder contrastar de una mejor manera el efecto de la planta, en comparación con ese material que actuara como agente o barrera física; así mismo el poseer una población de estudio muy pequeña, al igual que la muestra, lo que impidió realizar una correlación estadística que presentará mayor confiabilidad y seguridad al estudio.

Tal como se reporta en la presentación de resultados, se observaron ambas cepas en relación a su morfología en el microscopio de luz, y es por esto que se llevó a cabo la coloración de gram para ambas cepas bacterianas, no solamente para verificar su coloración positiva, que fue el resultado esperado, ya que ambas son gram positivas; sino también para verificar su morfología.

En el caso del *S. mutans* no presentó un cambio evidente en su morfología, pero sí en la formación de cadenas, ya que se observó disminución en el número de cocos formando cadenas. En el caso del *L. acidophilus* su morfología no se alteró, debido a que mantuvo su forma característica de bacilo, que es alargada. ^(14, 19)

Preliminares investigaciones confirman que existen más pruebas para la identificación de cepas bacterianas, como lo es la prueba bioquímica o serológica, sorbitol y manitol. Tal como se reportó en el cuadro no. 1, se llevó a cabo en ambas cepas, aún siendo estandarizadas, y se observó un aspecto general de turbidez para ambas cepas bacterianas, lo que representa un crecimiento bacteriano a partir de la fermentación de los azúcares, y brinda la información que las bacterias se encontraban activas al momento de realizar el estudio, efecto que respalda aún más los resultados obtenidos. ^(13, 14, 19)

En la metodología de siembra por azadas en agar planta, se observó el resultado obtenido que presentó un crecimiento intermedio, en donde al revisar las cajas de petri inoculadas, se observó que existía presencia de colonias bacterianas en las áreas por donde se realizó la siembra, ya que no cubrió la totalidad de la siembra con colonias, así como tampoco no hubo crecimiento.

Como se observó en el cuadro no. 2, donde se presentan los resultados para el microorganismo *S. mutans*, en base a la siembra por azadas, se realizó un total de cuatro azadas por caja de petri, tanto para los grupos experimentales como para los grupos control; en donde los grupos experimentales poseían el extracto de la planta, presentaron un crecimiento intermedio para ambos medios de cultivo, es decir, Mitis Salivarius y Müeller Hinton. En contraste con los grupos control en donde, en ambos medios presentaron un crecimiento ligeramente mayor, encasillándose en la clasificación de parcialmente completo, debido a que estos medios no presentaban adicionado el extracto de la planta.

De tal cuenta, al observar los resultados obtenidos con esta metodología para el microorganismo *S. mutans*, se concluye que el extracto de la planta posee un efecto bacteriostático, sobre la acción de crecimiento de este microorganismo, es decir, que limita su crecimiento pero no elimina a la cepa bacteriana.

Como se mencionó en el cuadro no. 3, que corresponde al microorganismo *L. acidophilus*, utilizando la misma metodología, se obtuvo un resultado bastante similar al obtenido con el microorganismo *S. mutans*, ya que presentó un patrón de crecimiento similar al anterior, tanto para el grupo experimental, que poseía el extracto de la planta, en donde cada azada realizada, se clasificó en crecimiento intermedio, para ambos medios de cultivo. De igual manera se presentó una clasificación similar al comportamiento de la otra bacteria en los grupos controles, presentando que las azadas se clasificaron en parcialmente completo.

Al realizar la observación del crecimiento del microorganismo *L. acidophilus*, en los grupos experimentales, se concluye que si existe un efecto inhibitorio en el crecimiento de dicho microorganismo, por lo que se dice que posee efecto bacteriostático, en donde su crecimiento se ve limitado o reducido sin eliminar por completo a la cepa bacteriana.

Al evaluar dicha metodología, por ser un ensayo en donde la muestra experimental fue demasiado pequeña, además de examinar que los resultados fueron los mismos para ambos microorganismos, se reporta solamente los resultados obtenidos y observados, sin realizar ninguna

correlación estadística, al no existir ningún parámetro para realizar alguna medición que sea posible contrastar con otra. Además por ser resultados similares, no es posible realizar el análisis estadístico.

De tal cuenta, al observar que sí hay efecto inhibitorio en la adición del extracto a los medios de cultivo en estudio, se concluye que para los dos microorganismos, el crecimiento es intermedio, dando como resultado que el efecto de la corteza de encino es bacteriostático, es decir, que altera el proceso de crecimiento en la bacteria y en la formación de colonias, por la presencia de taninos, que es el principio activo principal encontrado en la corteza del *Q. peduncularis*.^(2, 3, 19) lo que confirma a la hipótesis alterna y respalda a los resultados obtenidos en los estudios anteriores.^(6,19)

En la metodología de los discos de difusión como se presentó en el cuadro no. 4, los resultados para el microorganismo *S. mutans*, en donde los discos contenían el extracto de la corteza, se obtuvo un resultado de clasificación parcialmente sensible, obteniendo 7 discos de 8 en esta categoría, siendo la mayoría para el medio de cultivo Mitis Salivarius; así como 4 discos en la clasificación de intermedio para el medio de cultivo Müeller Hinton.

Basado en la operacionalización de la categoría de crecimiento reportadas en las definiciones de variables, los halos de inhibición son medidos en milímetros a su alrededor, por lo que se clasifica de acuerdo a su medida; en donde al verificar estos resultados, se determina que el efecto inhibitorio del extracto de la corteza es 90% de clasificación parcialmente sensible para el microorganismo *S. mutans*, en su medio de cultivo selectivo, y solamente un 10% en clasificación intermedio.

Así mismo, en el grupo control de esta misma metodología, los 4 discos se clasificaron en la categoría de resistente, debido a que no poseían el extracto de la corteza, es decir, que el 100% del grupo control no presentó ningún halo de inhibición alrededor del disco.

Establecido en estos resultados, se concluye que sí existe efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo *S. mutans*, adicionando el extracto de la corteza de encino a los discos de difusión, por lo que posee un efecto bacteriostático, es decir, que altera el proceso de crecimiento en la bacteria y en la formación de colonias. La presencia de taninos en el extracto de la corteza de *Q. peduncularis*, provoca una pérdida de la adhesión en las cepas de *S. mutans*, como también posee un efecto inhibitorio sobre enzimas por la precipitación de las proteínas.^(1, 2, 3, 19)

De igual manera, como se observa en el cuadro no. 5, donde se reporta los datos para el microorganismo *L. acidophilus*, utilizando la misma metodología, los discos que contenían el extracto en el medio de cultivo Agar Rogosa, en 6 de los 8 discos presentó una clasificación de parcialmente sensible, y los otros 2 discos se clasificaron en el encasillado de intermedio.

En el medio enriquecido de Müller Hinton, 3 de 4 discos se clasificaron en parcialmente sensible, y solamente 1 quedó en el encasillado de intermedio.

Basado en la operacionalización de la categoría de crecimiento reportadas en las definiciones de variables, los halos de inhibición son medidos en milímetros a su alrededor, por lo que se clasifica de acuerdo a su medida; en donde al verificar estos resultados, se determina que el efecto inhibitorio del extracto de la corteza es 75% de clasificación parcialmente sensible para el microorganismo *L. acidophilus*, en su medio de cultivo selectivo, y solamente un 25% en clasificación intermedio.

De la misma forma, en el grupo control, los 4 discos se clasificaron en la categoría de resistente, debido a que no poseían el extracto de la corteza, es decir, que el 100% del grupo control no presentó ningún halo de inhibición alrededor del disco.

Determinado en estos resultados, se concluye que sí existe efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo *L. acidophilus*, adicionando el extracto de la corteza de encino a los discos de difusión, por lo que posee un efecto bacteriostático, es decir, que altera el proceso de crecimiento en la bacteria y en la formación de colonias.

Así mismo, en el análisis estadístico, como se mencionó en la presentación de resultados, el nivel de significancia es de 0.05 por lo que existe diferencia significativa entre los grupos experimentales, en comparación de los grupos controles para ambas cepas bacterianas, por lo que se apoya la hipótesis alterna, en donde el efecto del extracto de la corteza de encino, es de inhibición en el crecimiento de los microorganismos *S. mutans* y *L. acidophilus*, interpretando que su efecto es bacteriostático.

XIII. CONCLUSIONES

- El extracto de la corteza de *Quercus peduncularis* provoca efecto inhibitorio en el crecimiento de colonias de los microorganismos cariogénicos *S. mutans* y *L. acidophilus*.
- El crecimiento del microorganismo *S. mutans* es inhibido en su medio de cultivo selectivo al adicionarle el extracto de la planta, en comparación con el grupo control.
- El crecimiento del microorganismo *L. acidophilus* es inhibido en el medio de cultivo selectivo, adicionándole el extracto de la planta en estudio, comparado con el grupo control.
- La clasificación obtenida para ambas metodologías, es de inhibición intermedia, lo cual ratifica que el efecto del extracto de *Q. peduncularis* es bacteriostático sobre ambos microorganismos en estudio.
- La utilización de algún agente físico que provocará una alteración en el crecimiento, habría aportado mayor posibilidad de respaldar el efecto inhibitorio de la corteza, debido a que no hubo un material adicional para comparar el extracto.
- El uso de los discos de difusión ofrece un resultado de interpretación más sencilla y práctica, así como una mejor clasificación al obtener las medidas en milímetros de cada disco.
- El uso de cepas estandarizadas, aporta un mayor respaldo en la certeza de la pureza de los microorganismos estudiados.

XIV. RECOMENDACIONES

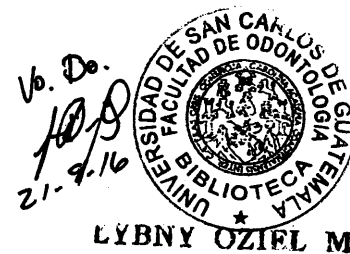
- Para futuras investigaciones, poseer un mayor número de población, así como la utilización de algún agente físico, para poder determinar y comparar el efecto inhibitorio de la corteza de encino.
- Que la línea de estudio continúe, con la aplicación in vivo del extracto, siguiendo el proceso de extracción bajo protocolo científico, ya que es una alternativa eficaz en la inhibición del crecimiento de microorganismos cariogénicos, pudiendo obtenerse de forma sencilla.
- Registrar la ubicación exacta de la muestra de la corteza de encino, ya que al ser especie específica facilitará su obtención para futuras investigaciones, teniendo la certeza que es la especie adecuada.
- Conservar cepas estandarizadas ATCC® en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, para agilizar el proceso investigativo de futuros estudios relacionados al tema.

XV. LIMITACIONES

- Una de las mayores limitaciones presentadas en esta investigación, fue que se utilizó una población y muestra demasiado pequeñas, lo que restringió realizar el análisis estadístico; así como no se utilizó un grupo control con algún agente físico que interviniera en el crecimiento bacteriano y que proporcionara una adecuada comparación.
- Otra limitación que presentó este estudio, fue la recolección de la muestra de la corteza de encino, debido a que por ser una especie de encino específica, tomó mayor tiempo que el estipulado, ya que existe gran variedad de especies de encinos en la región.
- Otra limitación presentada fue al momento de adquirir la cepa estandarizada de los microorganismos estudiados, ya que al tener que realizar el pedido a los Estados Unidos por medio del proveedor del país, el tiempo de envío, así como el de entrega se prolongó más de lo esperado, como también por su elevado costo.

XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia: Fitoquímica, plantas medicinales.** Trad. Ángel Villar del Fresno. 2 ed. España: Acribia. pp. 379-380-385-386.
2. Cáceres, A. (1996). **Plantas de uso medicinal en Guatemala.** Guatemala: Editorial Universitaria. pp. 163-164.
3. Cáceres, A. (2006). **Vademécum Nacional de Plantas Medicinales.** Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. pp. 91-92.
4. Cleaves Herrera, C. I. (1996). **La medicina que está en las plantas: Salud preventiva y uso de las plantas medicinales en el alivio o cura de algunas de las enfermedades más comunes en Guatemala.** Guatemala: Ceibas. pp. 34-35.
5. De León, H.; Grijalva R. y Pomes C. E. (1993). **Desarrollo de técnicas simplificadas para determinar agentes cariogénicos: Micrométodo de Huella para aislamiento y cuantificación de agentes cariogénicos.** Guatemala: USAC. pp. 1-11.
6. De León Mendizábal, A. M. (2001). **Estudio del efecto inhibitorio de la infusión de corteza de encino (*Quercus peduncularis*) sobre microorganismos cariogénicos estreptococo mutans y lactobacilo acidófilo, in vivo.** Tesis (Lic. Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología. 90 p.
7. Elston, R. C. (1990). **Principios de bioestadística.** Trad. María del Rosario Carsolio Pacheco. México: El Manual Moderno. pp. 283-284.
8. Estrada Roy, J. C. (1984). **Capacidad de formación de dextrán por el Estreptococo mutans, con relación a la dureza del agua.** Tesis (Lic. Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología. 89 p.

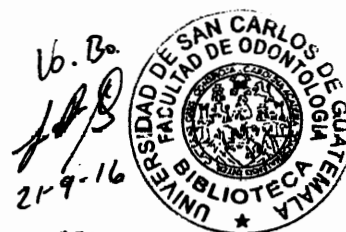


9. Evans, W. C. (1991). **Farmacognosia**. Trad. Jesús Cabo Torres. 13 ed. México: Interamericana. pp. 92-95- 412-414.
10. Govinden, L. P. (1998). **Introducción a la estadística**. 2 ed. Colombia: Interamericana. 207 p.
11. Haring, J. y Jansen, L. (2002). **Radiología dental: Principios y técnicas**. 2 ed. México: Interamericana. pp. 514-522.
12. Lanata, E. J. (2003). **Operatoria Dental: Estética y adhesión**. Argentina: Grupo Guía. pp. 27-30.
13. Liebana Ureña, J. (2002). **Microbiología oral**. 2 ed. España: Interamericana. pp. 561-570.
14. Negroni, M. (1999). **Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica**. Argentina: Médica Panamericana. pp. 203-209-220-225.
15. Nolte, W. (1985). **Microbiología odontológica**. Trad. María de Lourdes Hernández Cazares. 4 ed. México: Nueva Editorial Interamericana. 839 p.
16. Milián Rojas, E. E. (1988). **Efecto del extracto de corteza de encino sobre la formación de placa bacteriana**. Tesis (Lic. Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología. 45 p.
17. Pahlow, M. (1985). **El gran libro de las plantas medicinales: Salud a través de las fuerzas curativas de la naturaleza**. Trad. J. Tola y Julio Herrero. 5 ed. España: Everest. pp. 295-296.



LYBNY OZIEL MEJIA64

18. Paredes Barrios, K. F. (2001). **Evaluación del efecto residual inhibitorio del extracto de encino (*Quercus peduncularis*) a una concentración del 2% contra *S. mutans* y *L. acidophilus* en pacientes niños comprendidos entre las edades de 12-13 años estudio in vivo.** Tesis (Lic. Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología. 87 p.
19. Ralón Carranza, R. V. (1990). **Efectos de la acción de extractos de cuatro especies de encino (*Quercus spp.*) sobre la adherencia del dextrán producido por el *Streptococo Mutans*.** Tesis (Lic. Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología. 40 p.
20. Zea Rodríguez, I. del C. (2000). **Estudio del efecto inhibitorio del extracto de *Quercus sapotaefolio* (encino) al 2% sobre la producción de microorganismos *S. mutans* y *L. acidophilus* en estudio in vivo utilizando el micrométodo de huella. Realizado en la escuela oficial urbana mixta no. 65 “licenciado Ricardo Castañeda Paganini” en escolares de 10 a 14 años.** Tesis (Lic. Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología. 65 p.



LYBNY OZIFL MEJIA

XVII. ANEXOS

Anexo no. 1

AREA
DE CIENCIAS

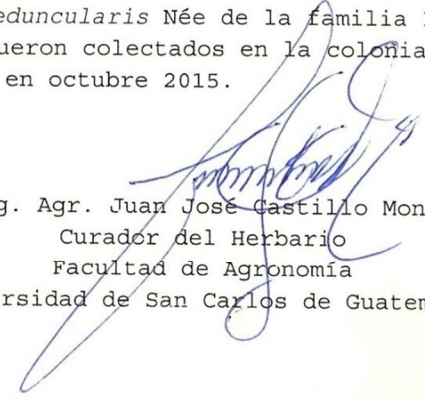
Guatemala 18 de abril de 2016

Br. Jorge Enrique Méndez Muñoz
Facultad de Odontología

Br. Méndez:

Se hace constar que los especímenes tenidos a la vista corresponden a la especie *Quercus peduncularis* Née de la familia Fagaceae.

Los especímenes fueron colectados en la colonia las Hojarascas, zona 1 de Mixco, Guatemala, en octubre 2015.


Ing. Agr. Juan José Castillo Mont
Curador del Herbario
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala



Edificio T-8, Oficina A-22, Ciudad Universitaria, Zona 12, Guatemala, C.A. 01012
Apartado Postal 1545. Teléfono: Directo (502) 2476-7677, PBX: 2443-9500 Ext. 1564 Fax: (502) 2476-9770.

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

I. DEFINICION

Las bacterias son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 24 a 48 horas en medios artificiales específicamente diseñados. El tamizaje de la actividad antibacteriana consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de una bacteria determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (500-1000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal.

II. OBJETIVO

Proporcionar instrucciones para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro*.

III. RESPONSABLE

Es responsabilidad de la persona designada el cumplimiento de este PEO, el cual debe ser ejecutado de forma correcta para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos a ensayar.

IV. DISTRIBUCION

Auxiliar de laboratorio o estudiantes

V. MATERIALES Y EQUIPO

- Agar Muller Hinton
- Asa de nicromo en argolla
- Autoclave
- Cajas de petri simples
- Caldo tripticasa soya
- Campana bacteriológica
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Etanol al 50%

- Etanol al 70%
- Incubadora a 36°C
- Mechero
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200 µL
- Puntas azules de 1000 µL
- Plantilla para siembra
- Refrigeradora
- Solución salina
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL

VI. PROCEDIMIENTO

Disolución del extracto

- En la balanza analítica pesar 30 mg de extracto a ensayar y disolverlo en 3 mL de etanol al 50% (hacer cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo).
- Agitar en un vortex hasta que este bien disuelto. Si no se disuelve utilizar un sonicador. En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25µL de dimetilsulfoxido (DMSO).
- Filtrar el extracto.

Filtración de extracto

- Trabajar la filtración en la campana de flujo laminar (previamente limpia, ver PEO de limpieza de campana).
- Aspirar el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL.
- Desenroscar la aguja y enroscar en la jeringa el filtro de 0.45 µm de diámetro.
- En un frasco estéril recibir el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

Preparación de Agar-Planta

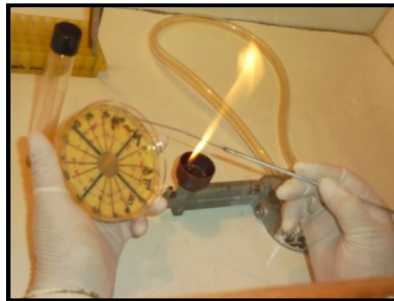
- Preparar tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar). Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C.
- En una caja de petri simple agregar 1.0 mL de la solución del extracto filtrado (este debe tener una concentración de 10 mg/mL) y los 9 mL de agar Mueller Hinton. Tapar la caja y homogenizar con movimientos circulares. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL.
- Dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en una caja de petri con agar tripticasa soya, incubar a 36°C durante 24 h.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36°C durante 24 h.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

Demostración de la actividad antibacteriana

- Inocular en las cajas con agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 min e incubar a 36°C durante 24 h.
- Utilizar como control negativo 9 mL de agar Muller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.



Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

BIBLIOGRAFÍA

- Cáceres, A et al. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62:195-202.
- CYTED. 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.
- España, SM et al. 1994 Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestital disorders. 5. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia* 65: 273-274.
- Mitscher LA, Darker S & Gollapudi A. 1987. A modern look at folkloric use a Anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 5: 1025-1041.
- Mitscher LA *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35: 157-166.

EXTRACCIÓN CONTINUA POR PERCOLACIÓN

I. DEFINICIÓN

La percolación consiste en hacer pasar el disolvente a través de la droga vegetal hasta su extracción completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la droga con el disolvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores los cuales son de cuerpo cilíndrico o cónico y están provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo de solvente.

II. OBJETIVO

Proporcionar instrucciones para la extracción continua de una droga vegetal utilizando la percolación.

III. RESPONSABLE

Es responsabilidad de la persona designada el cumplimiento de este PEO, este debe ser ejecutado de forma correcta para extraer los principios activos de una droga vegetal utilizando el equipo seleccionado (Percolador).

IV. DISTRIBUCIÓN

Auxiliar de laboratorio.

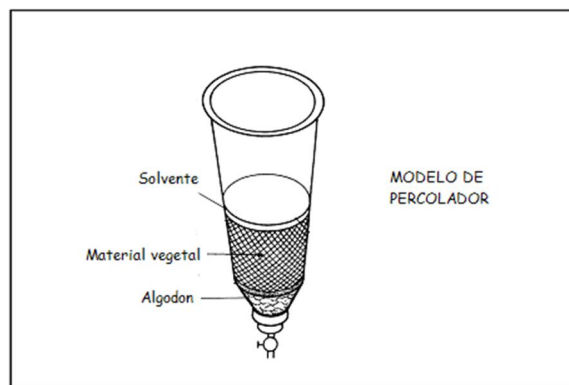
Estudiantes.

V. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS

- Algodón
- Balanza semianalítica
- Erlenmeyers
- Papel filtro
- Percolador de vidrio o acero inoxidable
- Vaso de precipitar

VI. PROCEDIMIENTO

- En un percolador previamente limpio y seco, colocar un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- Pesarse la cantidad de materia vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.
- Humedecer el material vegetal con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- Transferir todo el material al percolador y agregar disolvente hasta cubrir el material vegetal (hasta una pulgada sobre el nivel de materia vegetal).
- Dejar reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción lo que dependerá la cantidad de la materia vegetal (24-48 horas).
- Abrir la llave de la parte inferior y dejar gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Recoger el líquido en un erlenmeyer e ir añadiendo suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- El material sólido que ha quedado, se presiona fuertemente y el líquido obtenido se añade al percolado obtenido anteriormente.
- La solución obtenida puede utilizarse para producir extractos o tinturas. Para preparar extractos, el líquido obtenido (menstruo) se concentra en un rotavapor o en un equipo similar y se repite la operación hasta que se agote la droga con el disolvente recuperado; las tinturas solo se ajustan a volumen en función de la concentración deseada (1:5, 1:8 o 1:10)



VII. REFERENCIAS

- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega. 515 p.
- Medinilla, B. (1996). Manual de Laboratorio de Farmacognosia. Guatemala: USAC. 38 p.
- Real Farmacopea Española (2002) 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p.

CONCENTRACIÓN UTILIZANDO ROTAVAPOR

I. DEFINICIÓN

La concentración representa la etapa siguiente al proceso de extracción. El proceso de concentración busca aumentar el contenido de sólidos totales en el extracto con la finalidad de:

- a) alcanzar un determinado contenido del residuo seco
- b) producir extractos blandos
- c) como etapa preliminar en la producción de extractos duros,
- d) los extractos también pueden ser concentrados para la extracción en contracorriente con disolventes no miscibles, con miras a la fabricación de extractos purificados o el aislamiento de sustancias puras.

El equipo necesario para la concentración con recuperación de disolventes es el evaporador rotatorio, cuyo funcionamiento se basa en los siguientes principios:

- 1) se coloca la muestra en un balón de evaporación a 40°C que rota a una velocidad constante produciendo una película que aumenta la superficie de evaporación.
- 2) con la ayuda de una bomba se genera un vacío entre 30 y 300 mbar que facilita la evaporación sin necesidad de aumentar la temperatura.
- 3) el vapor del disolvente es condensado en el refrigerante que esta conectado a un sistema de enfriamiento que luego se colecta en un balón colector.

II. OBJETIVO

Proporcionar instrucciones para el manejo del evaporador rotatorio en la concentración de extractos.

III. RESPONSABLE

Es responsabilidad de la persona designada el cumplimiento de este PEO, este debe ser ejecutado de forma correcta para el buen uso del evaporador.

IV. DISTRIBUCIÓN

Auxiliar de laboratorio.

Estudiantes.

V. MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS

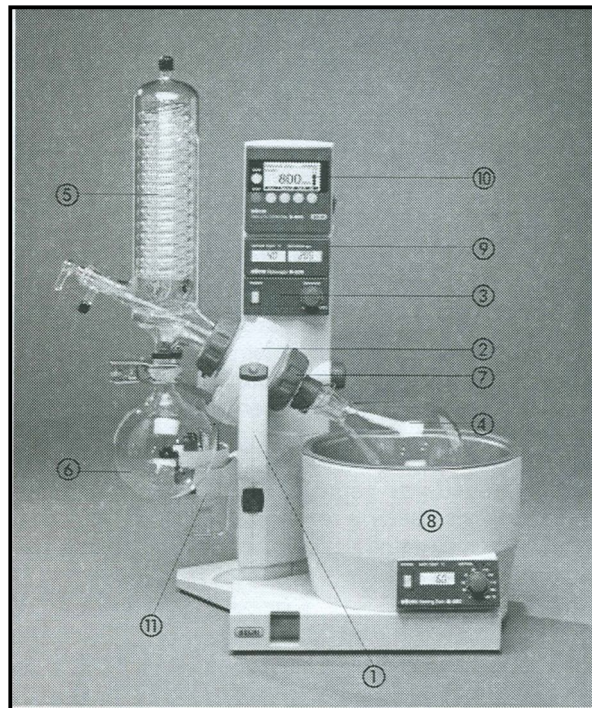
- Balón de 1000 mL
- Disolvente (etanol, metanol, diclorometano, hexano, pentano, etc.)
- Rotavapor (Balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta)
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua

VI. PROCEDIMIENTO

- Verificar que estén conectadas todas las conexiones eléctricas.
- Colocar el balón colector y fijarlo con la llave respectiva.
- Agregar agua al baño de calentamiento.
- Encender el baño y mantener la temperatura entre 50-60°C. Dependiendo del equipo puede haber pérdidas de 10-20°C entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en todo caso el balón de evaporación no deberá tener una temperatura mayor de 40°C.
- Revisar que la llave de alimentación del refrigerante esté cerrada.
- Llenar el balón con el percolado hasta la mitad.
- Colocar el balón con la muestra y sujetar al vástago con la llave correspondiente.
- Encender el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada (50 a 80 revoluciones).
- Conectar un sistema de enfriamiento (bomba de agua) y agregar hielo a la hielera. Dejar que enfríe unos cinco minutos.
- Mantener siempre el refrigerante frío cambiando regularmente los hielos.
- Encender la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- Cuando haya iniciado la destilación, apagar la bomba de vacío.
- Encender la bomba de vacío cuantas veces sea necesario hasta que se haya agotado el disolvente del balón de evaporación o ya no destile ningún líquido, lo que querrá decir que el vacío de nuestra bomba no es suficiente para evaporar la mezcla de disolventes contenida en el balón de evaporación.

VII. PARTES DEL ROTAVAPOR

1. Alzador rápido
2. Accionamiento
3. Cabezal electrónico.
4. Balón de evaporación.
5. Refrigerante.
6. Balón receptor.
7. Sistema de hermetización.
8. Baño calefactor.
9. Módulo indicador de velocidad de rotación y temperatura del vapor.
10. Control de vapor.
11. Conjunto de válvulas.



VII. RECOMENDACIONES

Aplicar vaselina al vástago rotatorio, a todas las llaves y juntas esmeriladas.

Mantener el sistema de refrigeración a baja temperatura, con recambio periódico de los hielo.

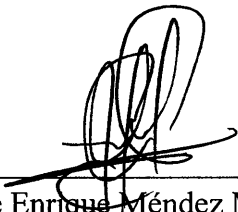
Dejar limpio y sin agua el rotavapor cuando no se utilice.

Desconectar los enchufes de la electricidad al terminar de utilizar el aparato.

VIII. REFERENCIAS

- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega. 515p.
- Manual del Fabricante Buchi Flawil: Buche Laboratorio. 44p.
- Medinilla, B. (1996). Manual de Laboratorio de Farmacognosia. Guatemala: USAC. 38p.
- Sharapin, N. (2000) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247p.

El contenido de esta tesis es única y exclusiva responsabilidad del autor

(f) 

Jorge Enrique Méndez Muñoz

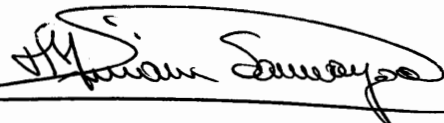
Firmas de Tesis

(f) 
Jorge Enrique Méndez Muñoz
SUSTENTANTE

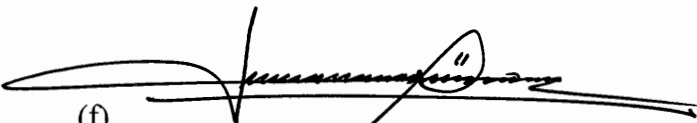
(f) 
Dr. Raúl Vitelio Palón Carranza
ASESOR DE TESIS

(f) 
Dr. Sergio García Piloña
PRIMER REVISOR
Comisión de Tesis



(f) 
Dra. Miriam Ninette Samayoa Sosa
SEGUNDA REVISORA
Comisión de Tesis

IMPRÍMASE:

Vo. Bo. (f) 
Dr. Julio Rolando Pineda Cordón
Secretario General
Facultad de Odontología
Universidad de San Carlos de Guatemala

