

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE ODONTOLOGÍA



Efecto antibacteriano “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* “Sangorache” sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de odontólogo

AUTOR: Br. HENRY PAÚL VALVERDE HARO

TUTOR: MsC. CECILIA BADILLO CONDE

RIOBAMBA – ECUADOR

AÑO 2016

PÁGINA DE REVISIÓN

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: EFECTO ANTIBACTERIANO “IN VITRO” DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE AMARANTHUS HYBRIDUS L “SANGORACHE” SOBRE LA CEPA DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS ATCC 4356, presentado por: Br. HENRY PAUL VALVERDE HARO, y dirigida por: MsC. CECILIA BADILLO CONDE.

Una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH.

Para constancia de lo expuesto firman:

Dra. Sandra Cruz

Presidenta del Tribunal

Dra. Blanca Badillo

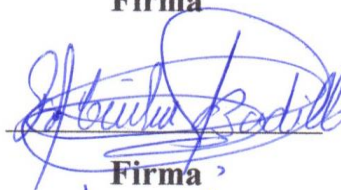
Miembro del Tribunal

Dra. María Calderón

Miembro del Tribunal



Firma



Firma



Firma

INFORME DE APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, Blanca Cecilia Badillo Conde docente de la carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Chimborazo en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema: **Efecto antibacteriano “in vitro” del extracto hidroalcohólico de Amaranthus hybridus L “Sangorache” sobre la cepa de Lactobacillus acidophilus ATCC 4356**, propuesto por el Br. Henry Paul Valverde Haro, egresado de la carrera de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, considero que este trabajo de investigación reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del tribunal de graduación.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



MsC. Blanca Cecilia Badillo Conde

DOCENTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN:

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, nos corresponde exclusivamente a: Henry Paul Valverde Haro y del Director del Proyecto; MsC. Cecilia Badillo Conde y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



Henry Paul Valverde Haro
C.I. 060358802-1

AGRADECIMIENTO

Debo expresar mi mayor agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias de la Salud y a la carrera de Odontología por el gran aporte académico y científico, brindado durante el transcurso de mi formación académica, además el agradecimiento profundo a la Facultad de Ingeniería con su carrera de Ingeniería Agroindustrial por haber dado las facilidades de uso del laboratorio de control de calidad a cargo de la Ing. María Fernanda Rojas.

A la MsC. Cecilia Badillo, por el aporte significativo de conocimiento y valiosa tutoría para sacar adelante este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres Rigoberto y Martha, que han sido el pilar fundamental y el apoyo constante durante estos años de estudio.

A mi esposa Adriana, por haber sido paciente y apoyarme en todo momento durante los días en los cuales fue realizada la presente investigación.

A mi hija Kaitlyn le dedico mi primer logro académico con todo mi amor.

Tabla de Contenido

PÁGINA DE REVISIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	¡Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	2
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GENERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. ESTADO DEL ARTE.....	5
4. METODOLOGÍA	13
4.1. Tipo de investigación	13
4.1.1. De acuerdo al objetivo que persigue:.....	13
4.1.2. De acuerdo a la técnica de contrastación:	13
4.2. Contexto temporal y geográfico	13
4.3. Diseño de la investigación.....	13
4.4. Universo de estudio	14
4.5. Muestra	14
4.6. Hipótesis	15
4.7. Variables de estudio	15
4.7.1. Variable Independiente.....	15
4.7.2. Variable Dependiente	15
4.7.3. Operacionalización de variables	15
4.8. Procedimiento	16
4.8.1. Proceso de recolección, lavado y desinfección de <i>Amaranthus hybridus</i> L 17	
4.8.2. Proceso de secado de las muestras de flores y hojas de <i>Amaranthus</i> <i>hybridus</i> L.	17
4.8.3. Proceso de maceración de las muestras de <i>Amaranthus hybridus</i> L (Sangorache).	17

4.8.4.	Filtrado al vacío de la muestra y destilación para la obtención de los metabolitos necesarios.....	18
4.8.5.	Análisis fitoquímico de las muestras para la determinación de la presencia de flavonoides.	18
4.8.6.	Preparación de cepa de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	18
4.8.7.	Tinción de Gram para identificación de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
4.8.8.	Preparación del inóculo	19
4.8.9.	Siembra de la cepa de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
4.8.10.	Prueba de sensibilidad con el extracto hidroalcohólico, incubación de la siembra	19
4.8.11.	Lectura de resultados	20
4.9.	Consideraciones éticas	20
CAPÍTULO IV		21
5.	RESULTADOS.....	21
5.1.	Planteamiento de hipótesis:	21
5.2.	Comprobación de la hipótesis.....	21
5.3.	Análisis estadístico de los resultados.....	22
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
7.1.	Conclusiones	31
7.2.	Recomendaciones.....	32
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9.	ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Variables: Independientes y Dependientes	16
Tabla 2 Resultados del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Amaranthus hybridus</i> L sobre el <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	22
Tabla 3 ANOVA de los resultados del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Amaranthus hybridus</i> L sobre la cepa de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	23
Tabla 4 Resultados del extracto hidroalcohólico de flores de <i>Amaranthus hybridus</i> L sobre el <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	24
Tabla 5 ANOVA de los resultados del extracto hidroalcohólico de flores de <i>Amaranthus hybridus</i> L sobre la cepa de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	25
Tabla 6 Resultados del control negativo de alcohol en diferentes concentraciones sobre el <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	25
Tabla 7 ANOVA de los resultados del control negativo de alcohol en diferentes concentraciones sobre el <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	26
Tabla 8 Resultados del control positivo con clorhexidina al 2% sobre el <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	26
Tabla 9 ANOVA de los resultados del control positivo con clorhexidina al 2% sobre el <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	27
Tabla 10 Medida cualitativa de sensibilidad según Duraffourd (1983).....	28

RESUMEN

La actividad antimicrobiana de las plantas se ha evaluado y conocido desde la antigüedad, teniendo como referencia algunos fármacos originados de plantas que son usados hasta la actualidad dentro de la odontología, es por eso que se buscó la posibilidad de introducir un estudio in vitro utilizando una planta andina propia de nuestra región y continente, a través de la elaboración de extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de *Amaranthus hybridus L.*, que se obtuvieron a través de un proceso de maceración, a estos extractos se les realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas de identificación de flavonoides, y se procedió a realizar las diferentes concentraciones que fueron 5%,10%,25%,50% y 75% . Los extractos de hojas y flores de sangorache, así como el alcohol utilizado como control negativo y la clorhexidina al 2% utilizada como control positivo, se colocaron en medios de cultivo MRS que contenían la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* principal microorganismo causante de lesiones de caries superficiales y profundas, que en conjunto con el *Streptococcus mutans* producen ácido láctico a partir de azúcares fermentables, por lo que son capaces de vivir en ambientes extremadamente ácidos, se realizó un antibiograma con el método (Kirby – Bauer), 24 horas posteriores a la siembra bacteriana se hizo la medición de los halos de inhibición. La presentación de resultados se hizo de forma cuantitativa con el análisis de ANOVA, comprobando estadísticamente la hipótesis nula planteada para los resultados, y de manera cualitativa utilizando las pautas de Duraffourd, indicando una actividad nula de los extractos hidroalcohólicos de *Sangorache* y control negativo con halos de inhibición por debajo a 8mm, pero si existe sensibilidad de la bacteria con la clorhexidina al 2% con halos de inhibición bacteriana entre 9 y 14 mm

PALABRAS CLAVES: Actividad antimicrobiana, Extracto hidroalcohólico, Flavonoides, Halos de inhibición, *Lactobacillus acidophilus*.

Abstract

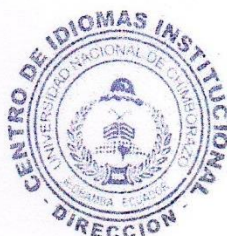
The antimicrobial activity of the plants has been evaluated and known since the antiquity, taking as a reference some medicines originated from plants that are used currently inside dentistry, that is why there was the possibility of introducing a study in vitro using a proper Andean plant of our region and continent, through the elaboration of the hidroalcoholic extracts made of leaves and flowers of *Amaranthus hybridus* L, that were obtained through a maceration process the same ones were tested qualitative and quantitative, coming across the identification of flavonoides, then the different concentration was done that were 5% 10% 25% 50 % and 75%. The extracts of leaves and flowers of sangorache, as well as the alcohol used as negative control and the clorhexidina to 2% used like positive control, placed in means of cultivation MRS that were containing the vine of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 main causative microorganism of injuries of superficial and deep cavities, which as a whole with the streptococcus mutants produce lactic acid from sugar fermentable, therefore they are capable of living in extremely acidic ambiances, by that an antibiogram was realized with the method (Kirby – Bauer), 24 hours later to the bacterial sowing there was done the measurement of the auras of bacterial inhibition with a rule of antibiogram. The results presentation were done of quantitative form with the analysis of results of a qualitative way using the duraffourd rules, which indicates a void activity for the extracts hidroalcoholic of *amaranthus hybridus* L and negative control for having measurements of the auras of inhibition for below to 8mm, but if sensibility of bacterium exists with the clorhexidina to 2% with auras of bacterial inhibition between 9 and 14 mm.

Key words: antimicrobial activity, extract hidroalcoholic, *amaranthus hybridus* L, Lavonoides, *Lactobacillus Acidophilus*, atcc 4356, Auras of inhibition.



SIGNATURE

Reviewed by Solis, Hugo
Language Center Teacher



1. INTRODUCCIÓN

1.1.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las principales enfermedades crónicas más comunes a nivel mundial que presenta el ser humano se encuentran la caries dental, la misma que es causada por una inapropiada higiene bucodental, producto del desconocimiento de métodos de prevención y promoción de salud oral y la inadecuada utilización de técnicas de cepillado dental, por lo que la cavidad oral está expuesta a la colonización de microorganismos de origen bacteriano y salival que forman la placa bacteriana (biofilm) por lo que es un factor determinante en la aparición de patologías bucodentales. Las patologías más comunes son las caries dentales y las enfermedades periodontales. (1)

Hoy en día, la fitoterapia, es una de las opciones más utilizadas para el área rural en países de creciente desarrollo; aunque en los países industrializados también existe el interés por conocer y aplicar estas nuevas alternativas debido a que las ventajas son diversas como: fácil acceso, fácil manejo, bajo costo y sobre todo seguros, porque disminuyen los efectos colaterales en los pacientes. (2)

Ecuador, es uno de los países con gran biodiversidad de flora y fauna, multicultural y multiétnico por lo que desde la antigüedad han utilizado para la curación distintas plantas con propiedades medicinales; es por eso que en la actualidad existen algunas plantas medicinales, que están siendo aplicadas en el área de la salud bucodental, para la elaboración de diversas alternativas de higiene dental como: enjuagues bucales, soluciones tópicos, pastas dentales, entre otras. (3)

Estudios científicos han evidenciado que los flavonoides, taninos y alcaloides encontrados en especies vegetales como el sangorache, actúan deteriorando los

sistemas enzimáticos que intervienen en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales afectando de esta manera la actividad celular de la bacteria. (4)

Existen diversos estudios en los últimos años a nivel universitario, que se han referido a las múltiples propiedades y beneficios que presentan las diferentes plantas medicinales, tratando de hallar las mejores propiedades antimicrobianas a partir de los principios fitoquímicos que permitan la creación de drogas fitoterapéuticas. (5) Teniendo en cuenta esto, la presente investigación tiene como pregunta principal para definir el planteamiento del problema ¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* (Sangorache) sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*?

1.2.JUSTIFICACIÓN

En la investigación de un método de control y prevención de la “caries dental” se han empleado diferentes estrategias, con las cuales no se ha conseguido una reducción de la incidencia de esta patología crónica mundial, esto se debe a que es una enfermedad impredecible, y multifactorial que aparece en cualquier etapa de la vida de las personas. Si no se da un tratamiento temprano, puede desencadenar en patologías más graves. (6)

La acción antibacteriana del extracto hidroalcohólico del *Amaranthus hybridus L* (Sangorache), ejercida sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*, tiene gran preponderancia científica ya que agrandaría las opciones de contar con sustancias inhibidoras bacterianas utilizadas en odontología con menor posibilidad de fracaso, mayor seguridad y menor costo.

Su importancia se basa en el descubrimiento de una nueva alternativa que por las propiedades fitoterapéuticas podría competir con los medicamentos usados en los tratamientos odontológicos, derivado de una planta nativa con propiedades medicinales que se cultiva en la región sierra del Ecuador, impulsando de esta manera la posibilidad de obtener un medicamento capaz de sustituir los tradicionales, con mejores propiedades terapéuticas y menos costo; cuyo objetivo esencial es utilizar alternativas naturales que están al alcance de todas las profesionales de la odontología.(7)

De esta manera se logrará disminuir el uso de soluciones químicas y se planteará para el futuro una nueva alternativa de producto odontológico disponible en el mercado para la resolución de tratamientos de caries dental y enfermedades periodontales con el empleo de un nuevo recurso a base de sangorache. (8)

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico del *Amaranthus hybridus L* (Sangorache) sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* en un estudio realizado in vitro.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Indagar los componentes químicos del *Amaranthus hybridus L*, especialmente sus componentes antimicrobianos.
- Caracterizar si las hojas o las flores de *Amaranthus hybridus L* presenta mayor concentración de componentes antimicrobianos, para actuar sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.
- Comprobar la inhibición de la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* con el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L*.

3. ESTADO DEL ARTE

La salud pública en odontología se define como la ciencia y práctica de prevenir enfermedades bucales, así como de promover y mejorar la calidad de vida mediante esfuerzos organizados de la sociedad. Es importante que los servicios dentales atiendan de manera efectiva las necesidades de salud bucal de los individuos y las comunidades. (9)

Según la Organización Mundial de la Salud, indica que la prevalencia de caries es del 60% al 90% en pacientes escolares y casi el 100% de los adultos de todo el mundo. Las enfermedades periodontales graves ocupan del 5% al 20% de prevalencia en los pacientes adultos de edad media y alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y los 74 años no tiene dientes naturales.(10)

Los factores determinantes para las dolencias bucodentales, tanto en niños como en adultos, es frecuente en ciertos grupos limitados por la pobreza, falta de educación, personas que tienen hábitos como el consumo de cigarrillos, alcohol y otras sustancias nocivas para la salud de la persona.(10)

La necesidad de encontrar nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas, para ser utilizadas en bacterias resistentes causantes de las diferentes infecciones a nivel bucal ha sido un reto para todas las organizaciones de salud a nivel mundial. Es por eso que el estudio de las plantas, es importante ya que se han encontrado presentes en la tierra mucho antes de que el hombre la poblara.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que cerca del 80% de la población todavía depende de las hierbas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades debido a la fácil disponibilidad, razones económicas y menos efectos secundarios, y es de uso especial en países en vías de desarrollo con gran diversidad de plantas que por tradición han sido utilizadas para la curación de diversas enfermedades. (11)Es por eso que la fitoterapia estudia la utilización de las

plantas medicinales y sus derivados con fines terapéuticos ya sea para prevenir, o para curar las enfermedades.

La fitoterapia como una ciencia se viene aplicando en la odontología moderna con la obtención de extractos de plantas con el fin de buscar agentes biocompatibles, aquellos que se van a utilizar de forma directa en los tejidos dentarios, es por eso que es importante mencionar que la actividad antibacteriana de las plantas se ha evaluado y conocido desde la antigüedad, teniendo como referencia algunos fármacos originados de plantas que son usados hasta la actualidad dentro de la odontología con resultados muy buenos. (12)

Las plantas son las principales fuentes de sustancias bioactivas (13) prototipos que pueden conducir a las drogas como: taninos, alcaloides, saponinas, glucósidos cardíacos, esteroides, terpenos, flavonoides, compuestos fenólicos, entre otros, los mismos que se encuentran presentes en hojas, tronco, látex, corteza, raíz, flor, y semillas. Son conocidas como metabolitos secundarios ya que están involucrados en el mecanismo de defensa, creando una barrera de protección natural de la planta en contra de los microorganismos, insectos y herbívoros que son las amenazas más frecuentes que tiene que soportar la planta durante su desarrollo. (14)

Actualmente existen diversos estudios de la capacidad antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, de las plantas presentes en la biodiversidad de nuestro país, por parte de las instituciones gubernamentales de investigación como el INIAP, INSPI, sumándose a ellas las investigaciones realizadas en las universidades ecuatorianas que han hecho énfasis en la búsqueda de alternativas de tratamiento tanto para aplicaciones en el área odontológica, como la médica.

Es por eso que la importancia que le da nuestro país al desarrollo de estudios fitoterapéuticos es muy alta, pero no existe la continuidad para el desarrollo de alternativas de tratamiento quedándose únicamente como la base científica

microbiológica, al ser un país en vías de desarrollo tiene en estos estudios las alternativas ideales para aplicación en las diferentes poblaciones a nivel rural en donde los factores de riesgo para presentar enfermedades bucodentales son muy altos. (1,4,5,7,8,11,15)

Entre los cultivos de la región alta andina del Ecuador se encuentra el ataco o sangorache, planta originaria de América, es una planta en proceso de recuperación de su cultivo, ya que por muchos años ha sido olvidada teniendo varios beneficios y usos tanto a nivel industrial como a nivel de investigación. (16)

El sangorache ha sido cultivado ancestralmente, utilizado por los pueblos aborígenes por sus propiedades medicinales tales como antiinflamatorias, antiespasmódicas, antibacterianas, cicatrizantes. Estas características que presentan se deben a los diferentes grupos fitoquímicos presentes como son flavonoides, clorofilas, aceites grasos entre otros.(17)

El sangorache se encuentra en los países de Ecuador, Perú, Colombia, Bolivia y el sur de Argentina, es conocido en el Ecuador con el nombre de ataco, sangorache, sangoracha, jataco y actualmente se lo conoce como amaranto de grano negro. Es una planta que se puede cultivar o puede crecer de forma silvestre sin una especificación del terreno en donde debe sembrarse, puede darse en climas fríos o zonas templadas, llegando a medir hasta 2 metros de alto. (16)

Se le atribuyen propiedades curativas para enfermedades como la osteoporosis, la diabetes mellitus, la obesidad, se usa en la hipertensión, para las personas que sufren de estreñimiento, y para problemas digestivos, pero actualmente investigaciones desarrolladas demuestran que el sangorache tiene efectos antimicrobianos, antifúngicos, y propiedades cicatrizantes, todos estos estudios han sido a nivel de laboratorio sin tener referencias bibliográficas de aplicación directa en personas. (15,18)

Estas propiedades, son atribuidas gracias a los químicos individuales con los que están formadas las plantas, el sangorache tiene diferentes compuestos fitoquímicos como el ácido fítico, terpenos, taninos, fenoles. Dentro del grupo de los fenoles se encuentran los flavonoides los mismos que para el desarrollo de este proyecto de investigación vamos a tomar en cuenta por las características antimicrobianas que contribuirán al tema de estudio. (18)

Los flavonoides se originan del latín flavus que significa de color entre amarillo y rojo, por lo que flavonoide, se refiere a un grupo aromático, que son pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno distribuido en las plantas, estando presente en la mayoría de plantas y frutas de colores amarillo, rojo y azul. Al consumirlos vamos a obtener propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. (19)

La realización del tamizaje fitoquímico es esencial ya que son pruebas preliminares sencillas y rápidas que detectan cualitativamente y cuantitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos fitoquímicos; esta prueba tiene su sustento científico gracias a la micro química, que evidencia estos grupos mediante formación de precipitados y/o coloraciones. Estas reacciones se caracterizan por ser selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan, detectando la mínima cantidad posible y utilizan un mínimo de equipo de laboratorio. (20)

En estudios de tamizaje fitoquímico realizado por Guapi en el 2014 y García en el 2015, demuestran la existencia de metabolitos secundarias de uso farmacológico, mencionando en base a la reacción de coloración determinada con el análisis de Shinoda, el extracto hidroalcohólico del sangorache contiene una cantidad moderada de flavonoides en el grano, difiriendo sus resultado con respecto al extracto hidroalcohólico de hojas en el que la presencia de flavonoides según las dos autoras va de escasa a moderada y siendo escasa la cantidad de flavonoides en la panoja de sangorache en los dos estudios realizados.(15,20)

La microbiología oral estudia la forma especial de las bacterias, los virus y los hongos presentes en la cavidad oral, la respuesta de los tejidos frente a los microorganismos, las relaciones entre sí y la cavidad bucal. En la cavidad oral la mayoría de las bacterias sufren una transición desde el modo de planctónicas a modo de biofilm (21) que son varias comunidades de microorganismos complejos embebidos en una matriz que cubre una superficie sólida, la forma en que se puede controlar la caries y las enfermedades periodontales es previniendo la formación de biofilm dental o eliminarlo con regularidad. (22)

Los *Lactobacillus* que proviene de la unión del prefijo: lacto que significa leche y la raíz: bacillus que quiere decir en forma de barra o vara. Son las principales especies utilizadas con actividad probiótica y terapéutica, son bacterias Gram positivas, anaerobias y estrictamente fermentativas, de tipo bacilar, que varían desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados. (23)

Es por eso que este estudio se enfoca en el género de *Lactobacillaceae*, que tiene cuarenta especies a nivel de la cavidad oral, que de acuerdo a sus actividades metabólicas sobre los hidratos de carbono se clasifican en tres grupos que son los homofermentativos, los heterofermentativos estrictos, y los heterofermentativos facultativos. (24)

El *Lactobacillus acidophilus* pertenece al grupo de homofermentativos las mismas que producen ácido láctico mediante la vía de Embden-Meyer (glucólisis) (25) y es encontrado en la cavidad oral al igual que el *Lactobacillus salivarius*, *gasseri* y *crispatus*. En la cavidad oral los lactobacilos se aíslan en la saliva, el dorso de la lengua y las placas supragingivales y radiculares, su concentración varía según el estado de salud oral del paciente y puede verse incrementado con la presencia de caries dental.(24)

En cuanto a los cultivos microbiológicos ideales para la identificación y crecimiento de los *Lactobacillus* se logra con una temperatura de 36 a 37°C, existiendo un medio líquido y sólido específico que permite el desarrollo de estos microorganismos que es el Man Rogosa y Sharpe el mismo que contiene peptona y glucosa que constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. (26)

Los *Lactobacillus* homofermentativos se relacionan en aquellos microorganismos relacionados a la caries dental, ya que tienen poder acidógeno y acidúrico iniciando su crecimiento con un pH salival de 5, son particularmente acidófilos y ejercen una débil, pero constante actividad proteolítica. Tienen poca capacidad de adhesión a superficies lisas por lo que utilizan un tipo de unión física en superficies de retención propias de la morfología de las piezas dentales.(24)

Los lactobacilos orales son colonizadores oportunistas que forman parte del biofilm y que surgen de los alimentos u otras fuentes fuera de la cavidad oral. En los adultos, los lactobacilos generalmente comprenden menos del 1% de la microflora de la placa supragingival, donde pueden inhibir patógenos orales existentes, el carácter patógeno oportunista de las bacterias del ácido láctico está comprobado por varios estudios recientes. (27)

La presencia de *Streptococcus mutans* es fundamental para el desarrollo de caries dental cabe destacar que no es el único microorganismo presente en esta patología, la presencia de *Lactobacillus acidophilus* en estadios iniciales como en estadios avanzados de la enfermedad de caries, se encuentra relacionada por la alta ingesta de carbohidratos en la dieta de las personas factor que es determinante según (28)

En lesiones de caries superficiales y profundas, la cepa de *Lactobacillus acidophilus* en conjunto con el *Streptococcus mutans* producen ácido láctico a partir de azúcares fermentables, por lo que son capaces de vivir en ambientes extremadamente ácidos. Estas dos bacterias son consideradas como las más cariogénicas asociadas a la caries de dentina. (29)

La caries dental en los países desarrollados, así como en los países en vías de desarrollo ha sido relacionada su origen por la nutrición de las personas, es por eso que existen pruebas a partir de estudios de intervención humana, epidemiológicos y estudios experimentales, que demuestran la asociación entre la cantidad y la frecuencia de la ingesta de azúcares libres con la caries dental. (30)

La creciente incidencia de enfermedades bucales y la resistencia a los antibióticos, exige encontrar nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas para ser utilizados contra estos microorganismos (11) conseguir tratamientos alternativos, seguros y eficaces con productos económicos a base de la variedad de plantas que con el transcurso de los años han sido ampliamente utilizadas en la medicina popular. (31)

Aunque los compuestos de fluoruro se han utilizado durante muchos años para inhibir la formación de la caries dental, y han funcionado en estadios tempranos de caries dental, existen estudios recientes en los que nos indican que a niveles altos son citotóxicos. (32)

Al igual que enjuagues bucales a base de clorhexidina que han sido la alternativa para inhibir enfermedades bucodentales, aunque son de un costo accesible para la población y de fácil acceso para personas de la zona urbana, es de muy limitado acceso en personas y familias de la zona rural de nuestro país (33).

Estudios recientes demuestran la eficacia de enjuagues bucales a base de plantas, en los que se compara su eficacia y su poder antimicrobiano, con los enjuagues comerciales, teniendo en ellos una buena alternativa de producción de productos para las zonas rurales de bajo costo y efectividad comprobada (33–35).

Los dentífricos han evolucionado y actualmente existen varios a base de plantas en el mercado que son usados para prevención de enfermedades bucodentales, entre ellos tenemos los dentífricos a base de arginina y aloe vera, que han sido sometidos a evaluaciones científicas ante microorganismos causales de caries dental, teniendo mejores resultados en pastas dentales a base de arginina, la misma que se puede obtener de las plantas. (36)

Es por eso que se busca iniciar con este estudio in vitro con el sangorache, que brinde alternativas para la elaboración de productos fitoterapéuticos para uso odontológico, accesibles al estudiante de odontología y al profesional odontólogo, en donde el paciente sea el único beneficiario al tener varias alternativas de prevención de enfermedades bucodentales, en donde el costo y el acceso a ellos no sea una limitación.

4. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

4.1.1. De acuerdo al objetivo que persigue:

Esta investigación es de tipo descriptiva transversal debido a que se describe los hallazgos que se encontrarán en un período de tiempo corto.

Es analítica porque permite examinar los tiempos en los que se emplearon las diferentes especies vegetales, desde los tiempos más remotos hasta la actualidad, a más de esto permite analizar los diferentes componentes que presentan las mismas y cómo estos influyen en la acción antimicrobiana.

4.1.2. De acuerdo a la técnica de contrastación:

Es de tipo experimental - in vitro, ya que se llevará a cabo en los laboratorios de control de calidad de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Chimborazo, en el mismo que se procederá a obtener el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus* L, al igual que se realizará los cultivos de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

4.2. Contexto temporal y geográfico

Elaboración de extracto hidroalcohólico y cultivo bacteriano en el laboratorio de control de calidad de ingeniería agroindustrial de la Universidad Nacional de Chimborazo durante los meses de julio, agosto y septiembre del 2016.

4.3. Diseño de la investigación

Investigación Experimental: proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos a determinadas condiciones o estímulos, para observar los efectos que se producen.

Se diferencia de la investigación de campo por la manipulación y control de variables.

Sometimiento de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, para observar los efectos antimicrobianos que ejerce el *Amaranthus hybridus* L.

4.4. Universo de estudio

Es una investigación bibliográfica y experimental por lo que la población es considerada desconocida.

4.5. Muestra

La población es considerada como desconocida por ello se calcula la muestra en función de la fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \times p \times q}{e^2}$$

Dónde:

Z= Valor de 1,96 (95% de confiabilidad)

p: Proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio.

Este dato es generalmente desconocido y se suele suponer que $p=q=0.5$ que es la opción más segura.

q: Proporción de individuos que no poseen esa característica, es decir, es $1-p$.

p=q= $0,5 * 0,5 = 0,25$ probabilidad de que suceda el evento

e = Es el margen de error de la muestra (5% al 15%)

$$n = \frac{((1,96)^2 \times (0,5) \times (0,5))}{(0,14)^2}$$

n = 49 al 14% del margen de error.

La muestra estará constituida por 49 halos de inhibición distribuidos en 11 cajas Petri con cultivos bacterianos correspondientes a *Lactobacillus acidophilus*, en medio de crecimiento Man Rogosa y Sharpe (MRS), las cuales contaron con las mismas propiedades y características, en las que se colocó 5 sensidisco con 50 uL de sustancia a analizar a diferentes concentraciones, a excepción del control positivo en el que se colocó 2 discos de antibiograma en 2 cajas Petri, lo que nos dará un total de 49 halos de inhibición bacteriana para la medición respectiva.

4.6.Hipótesis

Puede el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* “Sangorache” ejercer actividad antibacteriana sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.

4.7.VARIABLES DE ESTUDIO

4.7.1. Variable Independiente

- Extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L*.

4.7.2. Variable Dependiente

- Actividad antibacteriana sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.

4.7.3. Operacionalización de variables

	VARIABLES	DEFINICIÓN	DETERMINANTES	INDICADORES	ESCALAS
INDEPENDIENTE	Extracto hidroalcohólico	Es el resultado de someter a la planta en alcohol etílico.	Hojas y flores frescas y secas más el solvente alcohol etílico.	Presencia de flavonoides en el extracto.	Nominal
	<i>Amaranthus hybridus L</i>	Planta andina, propia de América es conocida como Sangorache, ataco o amaranto de grano negro	Extracto líquido de Sangorache.	Presencia de flavonoides en su composición	Nominal
DEPENDIENTE	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilo Gram positivo aerobio facultativo relacionado a la caries dental	Cultivo microbiano de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Tamaño del halo de inhibición bacteria alrededor del disco.	Cuantitativa (mm)

Tabla 1 Variables: Independientes y Dependientes

Fuente: Autor

4.8. Procedimiento

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se realizaron 9 actividades principales, 5 actividades se enfocan en la elaboración de los extractos hidroalcohólicos y en la realización de pruebas para la determinación de flavonoides, y las siguientes 4 actividades son las pruebas microbiológicas in vitro las mismas que se detallan a continuación:

4.8.1. Proceso de recolección, lavado y desinfección de *Amaranthus hybridus L*

Se recolectó la muestra de *Amaranthus hybridus L*, en el mercado mayorista de la ciudad de Riobamba, la misma que provenía de la población de Punín de la provincia de Chimborazo, se diferenció la muestra por hojas y flores, y se procedió al lavado utilizando 3 recipientes 2 para el lavado por inmersión con agua potable y 1 con la solución desinfectante de Hipoclorito de sodio al 2%.

4.8.2. Proceso de secado de las muestras de flores y hojas de *Amaranthus hybridus L*.

Se colocó las hojas y las flores de la planta en bandejas previamente desinfectadas con alcohol al 70%, las mismas que fueron llevadas al horno que se desinfecto con formol al 1% y se procedió al secado con una temperatura de 45 °C durante 14 horas.

4.8.3. Proceso de maceración de las muestras de *Amaranthus hybridus L* (Sangorache).

Una vez deshidrata las muestras de las hojas y de las flores se depositan en recipientes estériles y se procede a colocar etanol al 96% + Agua 4:1, se sella la muestra y se deja reposar en un lugar oscuro, realizando movimientos de los

recipientes con una frecuencia de 24 horas, el proceso de maceración se lo hizo por el lapso de 48 horas, 168 horas y 360 horas.

4.8.4. Filtrado al vacío de la muestra y destilación para la obtención de los metabolitos necesarios.

Tras la obtención de los macerados se realizó el filtrado al vacío de las muestras de flores y hojas de *Amaranthus hybridus L* con una bomba de vacío y con la utilización de filtros de membrana de poro de 0,5 micras, posterior a esto se realizó la destilación de las muestras para separar el alcohol etílico de los metabolitos de las hojas y flores del *Amaranthus hybridus L*, obteniendo los extractos hidroalcohólicos.

4.8.5. Análisis fitoquímico de las muestras para la determinación de la presencia de flavonoides.

En esta etapa de la investigación se realizó 3 análisis importantes, la prueba de la gota o reacción de Shinoda, el análisis de flavonoides por cromatografía de capa delgada y el análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-V, para la identificación y cuantificación de flavonoides la misma que nos sirvió para determinar que el extracto hidroalcohólico de las hojas presenta mayor cantidad de flavonoides en relación al extracto hidroalcohólico de las flores de *Amaranthus hybridus L*.

4.8.6. Preparación de cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*

La cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* fue conseguida por autogestión, a la cual se la reactivó utilizando caldo de cultivo MRS (Man Rogasa y Sharpe), realizando 3 repeticiones en microanaerobiosis utilizando el método de la vela por 48 horas a 37°C.

4.8.7. Tinción de Gram para identificación de *Lactobacillus acidophilus*

La tinción de Gram se la realizó para la identificación de la morfología *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, la misma que nos dio como resultado que es una bacteria Gram + y catalasa negativa.

4.8.8. Preparación del inóculo

Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* activadas se cultivaron en cajas Petri que contenían agar MRS (Man Rogasa y Sharpe), con el fin de obtener colonias jóvenes. Se hicieron 3 repeticiones en microanaerobiosis utilizando el método de la vela por 24 horas.

4.8.9. Siembra de la cepa de *Lactobacillus acidophilus*

La cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se diluyó en 3ml de suero fisiológico hasta que se obtuvo una turbidez semejante al tubo 05 de la escala Mac Farland, se agitó los tubos 30 segundos antes de proceder al sembrado en cajas Petri.

Con un hisopo estéril se procedió a la siembra en las cajas Petri que contenían agar MRS, en condiciones asépticas y a 10 cm del mechero.

4.8.10. Prueba de sensibilidad con el extracto hidroalcohólico, incubación de la siembra

Para esta prueba se utilizó la técnica de difusión de discos Kirby y Bauer (37), la cual consiste en sumergir los discos de antibiograma dentro de cada concentración (5%, 10%, 25%, 50% y 75%) del extracto hidroalcohólico de *Amaranthus Hybridus* L tanto de hojas como de flores preparados con anterioridad. En otras cajas Petri se

utilizó discos embebidos con concentración de alcohol etílico similar a las del extracto (5%, 10%, 50% y 75%) como prueba de control negativa. En una última caja Petri se utilizó clorhexidina al 2% de uso odontológico como prueba de control positiva.

Con la ayuda de un asa estéril se extrajo los discos de cada tubo y se colocaron sobre los cultivos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en las cajas Petri previamente preparadas. Se esperó 5 minutos y se procedió a voltearlas para proceder a la incubación en microanaerobiosis utilizando el método de la vela durante 24 horas.

4.8.11. Lectura de resultados

La lectura de resultados se las llevó acabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada una de las placas sembradas utilizando una regla (HiAntibiotic ZoneScale) y se utilizó la escala Duraffourd para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro según el halo de inhibición, que es la zona alrededor del disco donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria al cabo de 18 a 24 horas de incubación.

4.9. Consideraciones éticas

El presente estudio es de tipo experimental e in vitro, por lo que se utilizarán cultivos, razón por la cual no se necesita la aprobación del Comité de Ética para la realización del mismo.

CAPÍTULO IV

5. RESULTADOS

Los resultados del presente proyecto de investigación fueron analizados de manera estadística y cualitativa, utilizando para el análisis estadístico el análisis de varianza (ANOVA) en el programa Microsoft Office Excel 2013, y para el análisis cualitativa se utilizó la escala de Duraffourd. Es por eso que para el análisis estadístico me planteo las siguientes hipótesis.

5.1. Planteamiento de hipótesis:

Para el análisis de los resultados de manera estadística se planteó las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula: Ho: Puede el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* “Sangorache” no ejercer actividad antibacteriana sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.

Hipótesis de investigación: H1: Puede el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* “Sangorache” ejercer actividad antibacteriana sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.

5.2. Comprobación de la hipótesis

Para la comprobación de la hipótesis posterior a las 24 horas de incubación bacteriana se trabajó con la muestra de 49 halos de inhibición distribuidos en 11 cajas Petri con cultivos bacterianos correspondientes a *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*, en medio de crecimiento Man Rogosa y Sharpe (MRS), distribuidos en 3 cajas Petri para el extracto hidroalcohólico de hojas de *Amaranthus hybridus L* (Sangorache) en diferentes concentraciones, 3 cajas Petri para el extracto

hidroalcohólico de flores de *Amaranthus hybridus L* (Sangorache) en diferentes concentraciones, 3 cajas Petri para el control negativo de alcohol a diferentes concentraciones, y por ultimo 2 cajas Petri para el control positivo de clorhexidina al 2% con 2 discos de antibiograma por caja.

5.3. Análisis estadístico de los resultados

- La hipótesis nula representa que los promedios de las concentraciones no difieren entre ellas: μ_1 es igual μ_2 es igual μ_3 , es igual μ_4 , es igual μ_5 .
- Mientras que la hipótesis alternativa representa que el promedio de mis concentraciones difiere por lo menos alguna entre ellas. $H_1: H_1 \neq H_2$

Nivel de significancia: se trabajó con un nivel de significancia del 5% que equivale al 0,05

Cada grupo de datos fueron tomados y analizados por el análisis de varianza (ANOVA), y se obtienen los siguientes resultados.

CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE HOJAS	REPETICIONES (mm)		
	1	2	3
5%	4	2	2
10%	1	5	2
25%	4	4	5
50%	5	4	2
75%	5	3	3

Tabla 2 Resultados del extracto hidroalcohólico de hojas de *Amaranthus hybridus L* sobre el *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Análisis de varianza (ANOVA) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Amaranthus hybridus L* (Sangorache)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0,05	3	8	2,67	1,33
0,1	3	8	2,67	4,33
0,25	3	13	4,33	0,33
0,5	3	11	3,67	2,33
0,75	3	11	3,67	1,33

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6,27	4	1,57	0,81	0,55	3,48
Dentro de los grupos	19,33	10	1,93			
Total	25,6	14				

Tabla 3 ANOVA de los resultados del extracto hidroalcohólico de hojas de *Amaranthus hybridus L* sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Estadísticamente se puede concluir según el análisis de varianzas que el valor crítico de Fisher para las hojas es de 3,48 que es mayor que el valor de Fisher calculado que es 0,81 entonces se acepta la hipótesis nula concluyendo que las medias de los tratamientos mediante distintas concentraciones no difieren significativamente entre ellas.

CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE FLORES	REPETICIONES (mm)		
	1	2	3
5%	5	4	5
10%	3	5	3
25%	4	4	5
50%	2	4	2
75%	4	3	5

Tabla 4 Resultados del extracto hidroalcohólico de flores de *Amaranthus hybridus* L sobre el *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Análisis de varianza (ANOVA) del extracto hidroalcohólico de flores de *Amaranthus hybridus* L (Sangorache)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0,05	3	14	4,67	0,33
0,1	3	11	3,67	1,33
0,25	3	13	4,33	0,33
0,5	3	8	2,67	1,33
0,75	3	12	4,00	1,00

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7,07	4,00	1,77	2,04	0,16	3,48
Dentro de los grupos	8,67	10,00	0,87			
Total	15,73	14,00				

Tabla 5 ANOVA de los resultados del extracto hidroalcohólico de flores de *Amaranthus hybridus L* sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Estadísticamente se puede concluir según el análisis de varianzas que el valor crítico de Fisher para las flores es de 3,48 que es mayor que el valor de Fisher calculado que es 2,04 entonces se acepta la hipótesis nula concluyendo que las medias de los tratamientos mediante distintas concentraciones no difieren significativamente entre ellas.

CONCENTRACIONES DEL ALCOHOL ETÍLICO	REPETICIONES (mm)		
	1	2	3
5%	1	1	1
10%	2	1	1
25%	1	1	1
50%	1	1	2
75%	1	1	1

Tabla 6 Resultados del control negativo de alcohol en diferentes concentraciones sobre el *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Análisis de varianza (ANOVA) del alcohol etílico en diferentes concentraciones utilizado como control negativo.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0,05	3	3	1,00	0,00
0,1	3	4	1,33	0,33
0,25	3	3	1,00	0,00
0,5	3	4	1,33	0,33

0,75 3 3 1,00 0,00

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,4	4	0,1	0,75	0,58	3,48
Dentro de los grupos	1,33	10	0,13			
Total	1,73	14				

Tabla 7 ANOVA de los resultados del control negativo de alcohol en diferentes concentraciones sobre el *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Estadísticamente se puede concluir según el análisis de varianzas que el valor crítico de Fisher para el alcohol utilizado en distintas concentraciones como control negativo es de 3,48 que es mayor que el valor de Fisher calculado que es 0,75 entonces se acepta la hipótesis nula concluyendo que las medias de los tratamientos mediante distintas concentraciones no difieren significativamente entre ellas.

CONTROL POSITIVO CLORHEXIDINA	REPETICIONES (mm)	
	1	2
2%	10	11
2%	11	10

Tabla 8 Resultados del control positivo con clorhexidina al 2% sobre el *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Análisis de varianza (ANOVA) de la clorhexidina al 2% utilizada como control positivo.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0,02	2	21	10,5	0,5
0,02	2	21	10,5	0,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Probabilidad F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0	1	0	0	18,51
Dentro de los grupos	1	2	0,5		
Total	1	3			

Tabla 9 ANOVA de los resultados del control positivo con clorhexidina al 2% sobre el *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Para analizar los datos de la clorhexidina tome 4 muestras diferentes debido a que existen estudios que efectivamente nos indican que la clorhexidina al 2% ejerce actividad antibacteriana, pero idénticamente al hacer el estudio estadístico mediante el análisis de varianza se observa que el valor crítico de Fisher es 18,51 y supera al valor de Fisher calculado 0 en consecuencia se concluye que no existe diferencias significativas entre los promedios de los diferentes tratamientos.

De lo que se pudo observar mediante este análisis de varianza, es que en la tabla de los datos obtenidos en las hojas las que tienen la probabilidad de ejercer actividad antibacteriana en un 55% en relación a todas las concentraciones trabajadas.

Mientras que en los datos obtenidos de las flores de sangorache se observa que ejerce actividad antimicrobiana en un 16%, en cuanto a los datos de control que se tomaron con el alcohol en un 58% y la clorhexidina con un 100%.

Para el análisis cualitativo de las medidas obtenidas se utilizó la escala de Duraffourd (1983), el mismo que presenta las siguientes pautas de sensibilidad bacteriana ante diferentes sustancias:

PAUTAS DURAFFOURD ANTE SENSIBILIDAD DE UNA SUSTANCIA		
Nula	(-)	Inferior o igual a 8 mm
Sensible	(+)	De 9 a 14 mm
Muy sensible	(++)	De 15 a 19 mm
Sumamente sensible	(+++)	Igual o superior a 20 mm

Tabla 10 Medida cualitativa de sensibilidad según Duraffourd (1983)

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Basado en los resultados obtenidos de las mediciones de los halos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Amaranthus hybridus L* (Sangorache), bajo las pautas de Duraffourd se puede interpretar que los extractos en las diferentes concentraciones sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* tuvo un efecto antimicrobiano nulo porque todas las medidas se encuentran inferior a 8mm.

Con respecto a los resultados obtenidos de las mediciones de los halos de inhibición bacteriana de la prueba de control negativo con alcohol a las mismas concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de *Amaranthus hybridus L* utilizados en este proyecto de investigación, bajo las pautas de Duraffourd se puede interpretar que el alcohol en las diferentes concentraciones sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* tuvo un efecto antimicrobiano nulo porque

todas las medidas se encuentran por debajo a los 8mm y no superan los 2mm de inhibición bacteriana por lo no existe influencia alguna en los resultados de los extractos hidroalcohólicos.

Los resultados de las mediciones de los halos de inhibición bacteriana de la clorhexidina al 2%, bajo las pautas de Duraffourd se puede interpretar que la clorhexidina al 2% sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 tuvo un efecto antimicrobiano sensible porque los halos de inhibición se encuentran en el rango de 9 a 14mm, siendo la medida más grande obtenida 11mm.

Por lo tanto, el efecto antimicrobiano estadísticamente y cualitativamente nos indica que los extractos hidroalcohólicos de *Amaranthus hybridus* L de hojas y flores no tienen el poder antimicrobiano que necesitamos para inhibir el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La cavidad oral al ser un ecosistema con aproximadamente 500 a 700 especies bacterias presentes en mucosas y dientes. La presencia de *Lactobacillus acidophilus* en la patogénesis de la caries dental está demostrado en diversos estudios es por eso que tomar medidas direccionadas a la disminución de este microorganismo, desde estadios tempranos favorecerá evitar la presencia de caries en la población mundial.

En tal sentido en el presente estudio el uso de *Amaranthus hybridus* L a diferentes concentraciones como principio activo para la elaboración de productos fitoterapéuticos de uso odontológico, que actúen sobre el crecimiento de una cepa estándar de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, la misma que podría aportar a la disminución de la caries dental desde su etiología.

En estudios realizados por Guapi (2014) y Salazar (2015), concluyen a través del tamizaje fitoquímico la existencia de metabolitos secundarios de interés farmacológico en especial de flavonoides que le da la propiedad antimicrobiana al

sangorache, la misma que fue comprobada en este estudio a través del ensayo de Shinoda y por la cromatografía de capa delgada.

En el estudio de Sandoval en el 2015 (23), concluye a través de la realización de un colutorio a base de ciruela pasa, que posee escasa actividad antimicrobiana frente al *Lactobacillus acidophilus*, recomendando el uso de un colutorio comercial, en el cual demuestra la resistencia de la bacteria contra las propiedades fitoterapéuticas de la ciruela pasa.

Se concuerda con el estudio realizado por García en el 2015 (15), en donde los resultados obtenidos de los extractos hidroalcohólicos de Sangorache tuvieron halos de inhibición muy pequeños, considerándose como actividad antimicrobiana nula en aquellas cepas bacterianas utilizadas en ese estudio.

Además se pudo evidenciar que la clorhexidina al 2% utilizada como prueba de control positivo, tras la revisión bibliográfica previa efectivamente tiene un efecto antimicrobiano que con la escala de Duraffourd demuestra que el *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* es sensible con halos de inhibición bacteriana de 10 a 11 mm concordando con los estudios realizados previamente con este medicamento de uso odontológico.(35,36)

Las condiciones en las cuales se recolecto la muestra, la época en la que se recolecto, la zona geográfica en donde fue cultivada la planta, además de la altura en la cual fue recolectada, pueden ser elementos para que la presencia de metabolitos secundarios aumente o disminuya dando variantes en los resultados (15).

Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio revela que el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* tanto de hojas como flores, en concentraciones del 5%, 10%, 25%, 50% y 75% tiene nula actividad antimicrobiana sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*, ya que las medidas de los halos de inhibición son menores a 8 mm

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

- Se logró evaluar el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico del *Amaranthus hybridus L* (Sangorache) sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* durante la ejecución de este estudio in vitro.
- Se determinó a través de análisis cualitativos y cuantitativos que las hojas de *Amaranthus hybridus L* presenta mayor concentración de flavonoides con respecto a las flores, que, al ser componentes antimicrobianos, actuaron sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*.
- Se comprobó la inhibición antimicrobiana de la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* con el extracto hidroalcohólico de *Amaranthus hybridus L* de hojas y flores con halos de inhibición bacteriana de 2 a 5 mm.
- Se determinó que el extracto de hojas y flores de *Amaranthus hybridus L* ejerce una nula actividad antimicrobiana sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* según la escala de Duraffourd, sin una variación significativa de los resultados entre los extractos.

7.2.Recomendaciones

- Diseñar nuevas investigaciones utilizando extractos hidroalcohólicos de plantas, sobre la cepa de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* para el aporte científico en el área de odontología.
- Realizar todos los cultivos bacterianos de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* en agar MRS por las excelentes propiedades que este medio de cultivo selectivo de *Lactobacillus* ofrece, en microanaerobiosis.
- Demostrar las propiedades fitoterapéuticas del *Amaranthus hybridus L* sobre otras especies de microorganismos presentes en la cavidad oral, responsables directos de causar patologías a nivel de la cavidad bucal.
- Potencializar el efecto antimicrobiano del *Amaranthus hybridus L* (Sangorache) con otras sustancias antimicrobianas para evaluar su efecto antimicrobiano.
- Conservar la cepa bacteriana de *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* que reposa en la carrera de Ingeniera agroindustrial para futuras investigaciones a nivel de la carrera de odontología.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibarra S. Estudio in vitro del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. (Eucalipto) en comparación al Hipoclorito de sodio al 2,5% y Gluconato de clorhexidina al 2%, sobre cepas de *Enterococcus faecalis*. Vol. 1, D-space UCE. Universidad Central del Ecuador; 2014.
2. Haro A. Estudio in vitro de la eficacia antibacteriana entre el extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) al 100% e hipoclorito de sodio al 5,25% sobre el *Enterococcus faecalis*. Universidad Central del Ecuador; 2015.
3. Rueda M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de Propóleo ecuatoriano vs Gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans*. Vol. 1, D-space UCE. Universidad Central del Ecuador; 2015.
4. Zambrano M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de *Allium sativum* (Ajo) blanco, púrpura y Clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Vol. 53, D-space UCE. Universidad Central del Ecuador; 2015.
5. Sucuzhañay M. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre cepa de *Streptococcus mutans*. estudio in vitro. Vol. 1542, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Universidad Central del Ecuador; 2015.
6. Chamorro A. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Botoncillo (*Acmella repens*) en diferentes concentraciones sobre la cepa de *Porphyromona gingivalis* atcc® 33277™. Vol. 53, D-space UCE. Universidad Central del Ecuador; 2016.
7. González V. Efecto antimicrobiano de la infusión de manzanilla sobre el *actinomyces odontolyticus* y el *actinomyces viscosus*: estudio in vitro. Universidad Central del Ecuador; 2016.
8. Aigaje A. Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis* estudio in

- vitro. Vol. 1, D-space UCE. Universidad Central del Ecuador; 2016.
9. Javier D la F, María S, María N. Promoción y educación para la salud en odontología. Primera Ed. Dr. Martín Martínez Moreno, editor. México: El Manual Moderno , S . A de C . V; 2014. 126 p.
 10. World Health Organization. Organización Mundial de la Salud | Salud bucodental [Internet]. Web de la OMS. 2012. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
 11. Shetty SB, Mahin-Syed-Ismail P, Varghese S, Thomas-George B, Kandathil-Thajuraj P, Baby D, et al. Antimicrobial effects of Citrus sinensis peel extracts against dental caries bacteria: An in vitro study. J Clin Exp Dent. 2016;8(1):e71–7.
 12. Shah S, Venkataraghavan K, Choudhary P, Mohammad S, Trivedi K, Shah S. Evaluation of antimicrobial effect of azadirachtin plant extract (Soluneem™) on commonly found root canal pathogenic microorganisms (viz. Enterococcus faecalis) in primary teeth: A microbiological study. J Indian Soc Pedod Prev Dent [Internet]. 2016;34(3):210. Available from: <http://www.jisppd.com/text.asp?2016/34/3/210/186741>
 13. Soediono B, Lewandowski CM. Atividade antiproliferativa de espécies vegetais do pantanal brasileiro. Vol. 1, Journal of Chemical Information and Modeling. Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul; 2014.
 14. Barad M, Ishnava kalpesh, Chauhan J. Anticariogenic activity and phytochemical studies of crude extract from some Indian plant leaves. J Intercult Ethnopharmacol [Internet]. 2014;3(2):1. Available from: <http://www.scopemed.org/?mno=151146>
 15. Garcia D. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género Amaranthus aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013 – mayo de 2014 [Internet]. Vol. 1, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. Universidad Nacional de Chimborazo; 2015. Available from: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1305/1/UNACH-EC->

LAB.CLIN-2015-0004.pdf

16. Peralta E. El amaranto en Ecuador. 2012;(1998):1–43. Available from: [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/ESTADO DEL ARTE DEL AMARANTO EN ECUADOR.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/ESTADO_DEL_ARTE_DEL_AMARANTO_EN_ECUADOR.pdf)
17. En N, Peralta E, Mazón N, Rivera M, Murillo Á. Importancia del Ataco, Sangorache o Amaranto de grano Quito, Ecuador. Quito, Ecuador; 2013.
18. Salazar D. “Evaluación de la actividad cicatrizante de geles elaborados a partir de extractos lipídicos y etanólicos de Sangorache (*Amaranthus hybridus* L) sobre heridas producidas en ratones (*Mus musculus*). ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO; 2015.
19. Escamilla Jiménez CI, Cuevas Martínez YE, Guevara Fonseca J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Fac Med UNAM* [Internet]. 2009;52(2):73–5. Available from: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
20. Guapi J. Caracterización bromatológica y fotoquímica de los granos y hojas del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), Amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y Sangorache (*Amaranthus hybridus* L.). Universidad Nacional de Chimborazo; 2014.
21. Barad M, Ishnava kalpesh, Chauhan J, Cura F, Palmieri A, Girardi A, et al. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2013;3(4):1373–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804050>
22. Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2014;6(4):189–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257882>
23. Sandoval P. “Efecto inhibitor del colutorio de Ciruela pasa sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, y comparación con dos

- colutorios comerciales.” [Quito, Ecuador]: Universidad Central del Ecuador; 2015.
24. Liebana J. Microbiología Oral. Segunda Ed. Granada; 2002. 710 p.
 25. Torres V. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp., *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. Universidad Central del Ecuador; 2013.
 26. S.A D. Medio de cultivo Bacteriología General. México; 2015.
 27. Callaway A, Kostrzewa M, Willershausen B, Schmidt F, Thiede B, Küpper H, et al. Identification of lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Lab*. 2013;59(11–12):1373–9.
 28. Loyola MC. Crecimiento in Vitro De *Streptococcus Mutans* Y *Lactobacillus*. 2006;3(1):2–6.
 29. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo ECM. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(6):2–9.
 30. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr* [Internet]. 2004;7(1A):201–26. Available from: <Go to ISI>://WOS:000189377500007
 31. Simões CACG, Conde NC de O, Venâncio GN, Milério PSSL, Bandeira MFCL, da Veiga Júnior VF. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. *Open Dent J* [Internet]. 2016;10(Suppl-1, M6):188–95. Available from: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TODENTJ-10-188>
 32. Yang Y, Park B, Hwang E, You Y. Composition Analysis and Inhibitory Effect of *Sterculia lychnophora* against Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *Hindawi Publ Corp* [Internet]. 2016;2016:9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8163150>

33. López D. Comparación de la eficacia entre enjuagues bucales de gluconato de clorhexidina al 0,12% y de manzanilla con bicarbonato de sodio, en pacientes con gingivitis inducida por placa bacteriana. Universidad de las Américas; 2015.
34. Chica P. Utilidad de un enjuague bucal a base de *Salvia officinalis* como coadyuvante en el tratamiento de pacientes que presentan gingivitis inicial. [Internet]. Universidad Central de Ecuador; 2015. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3014/1/T-UCE-0011-123.pdf>
35. Urbina L. Efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Universidad de Trujillo; 2016.
36. Neira K. “Análisis in vitro de tres dentífricos con agentes antibacterianos y su eficacia frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356).” Universidad Central del Ecuador; 2016.
37. Bernal R. M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica* [Internet]. 1984;4(3–4):112. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>

9. ANEXOS

Procedimientos del proyecto de investigación



A) Recolección de muestra B) Muestra de hojas
C) Muestra de flores D) Desinfección de muestra

Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



A) Colocación de muestra en bandejas específicas del horno B) Muestra de flores
llevadas al horno C) Muestra de hojas llevadas al horno

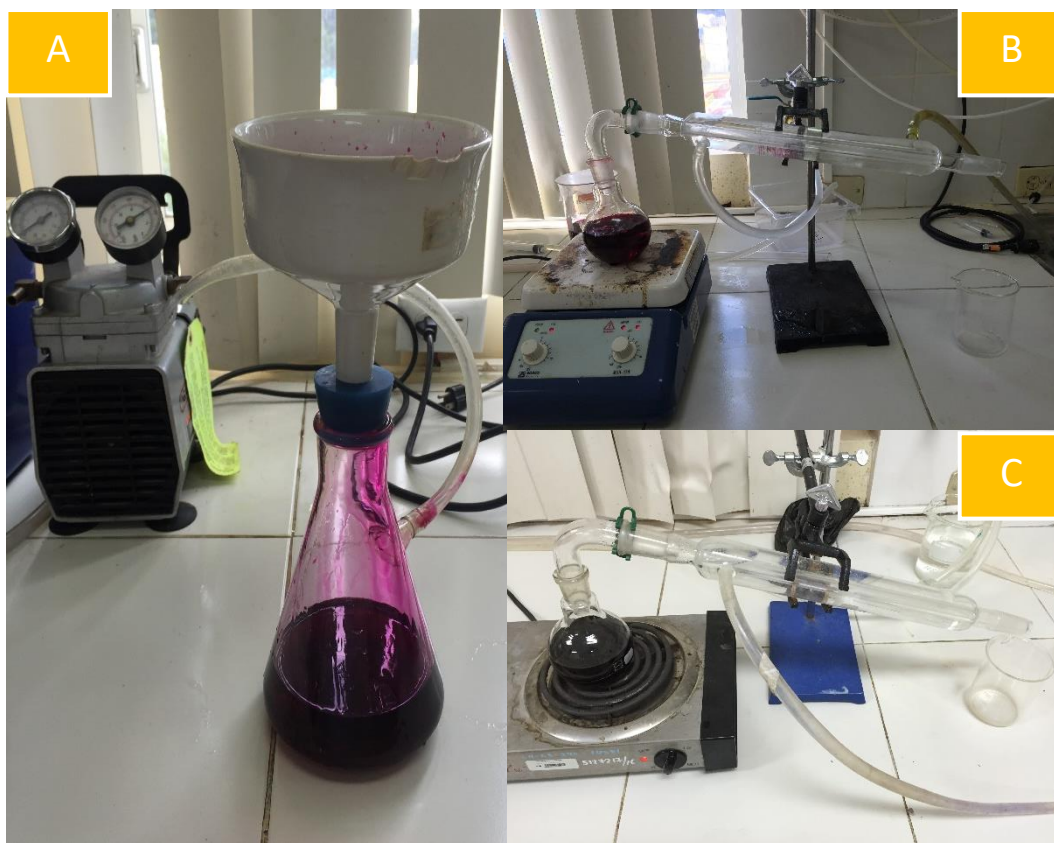
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



A) Muestra de maceración de hojas B) Muestra de maceración de flores

Fuente: Investigación

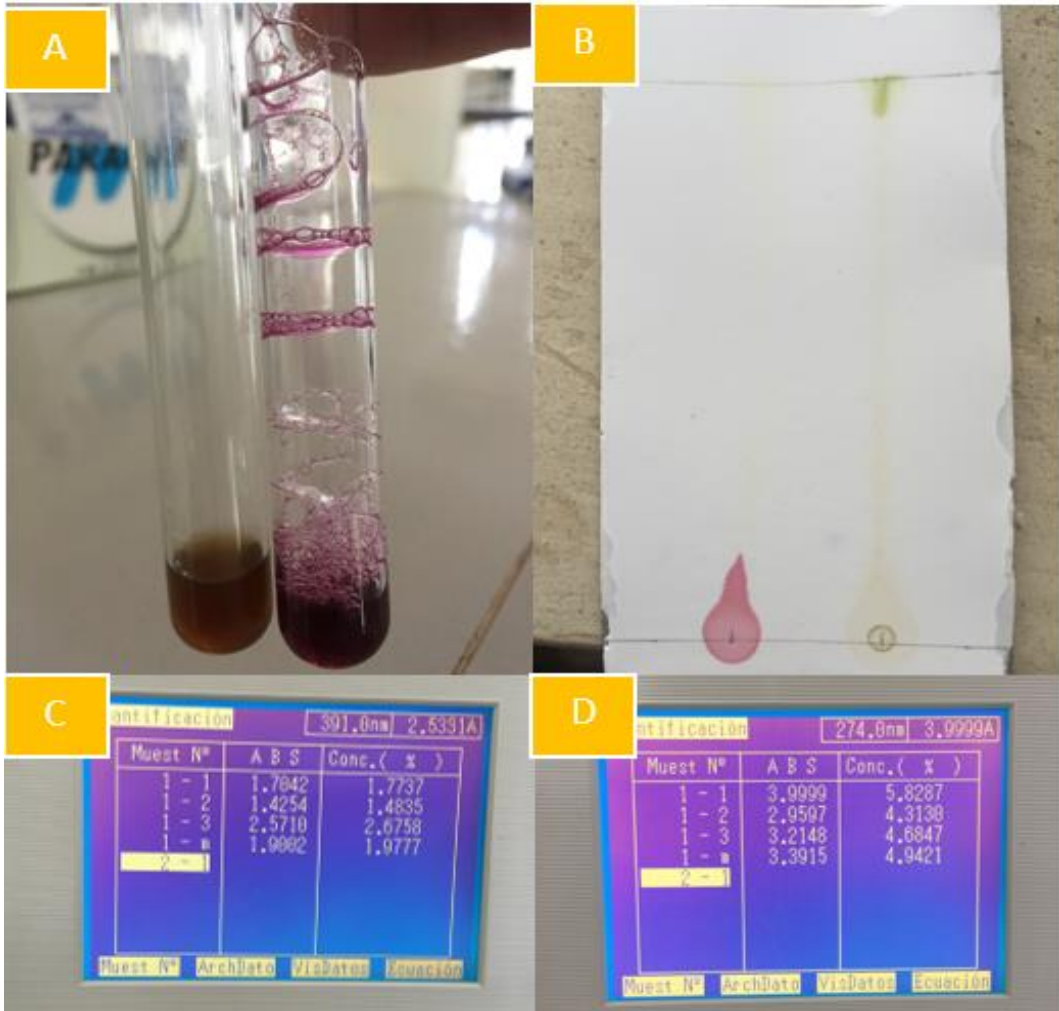
Elaboración: Autor



A) Filtrado al vacío de la muestra de flores B) Destilación de extracto hidroalcohólico de Sangorache, muestra de flores C) Destilación de extracto hidroalcohólico de Sangorache, muestra de hojas

Fuente: Investigación

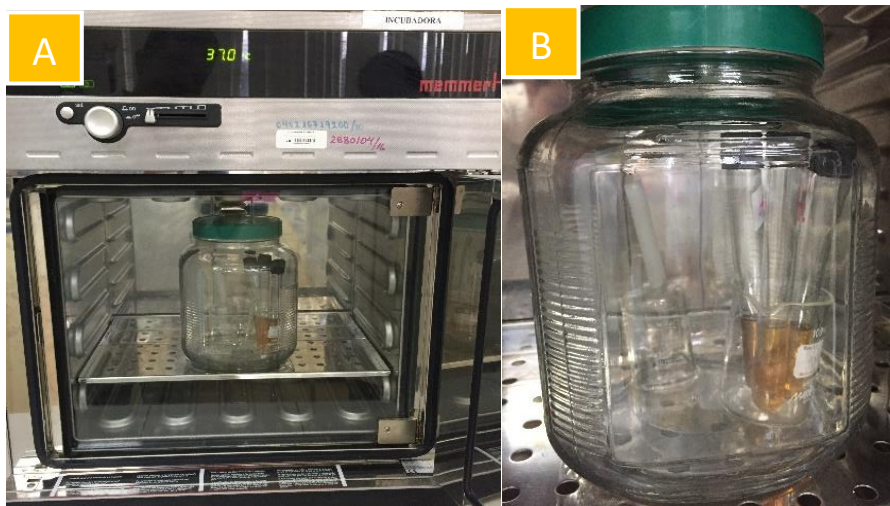
Elaboración: Autor



A) Reacción de Shinoda de hojas y flores B) Cromatografía de capa delgada de flores y hojas C) Análisis cuantitativo por espectrofotometría de la muestra de flores D) Análisis por espectrofotometría de la muestra de hojas

Fuente: Investigación

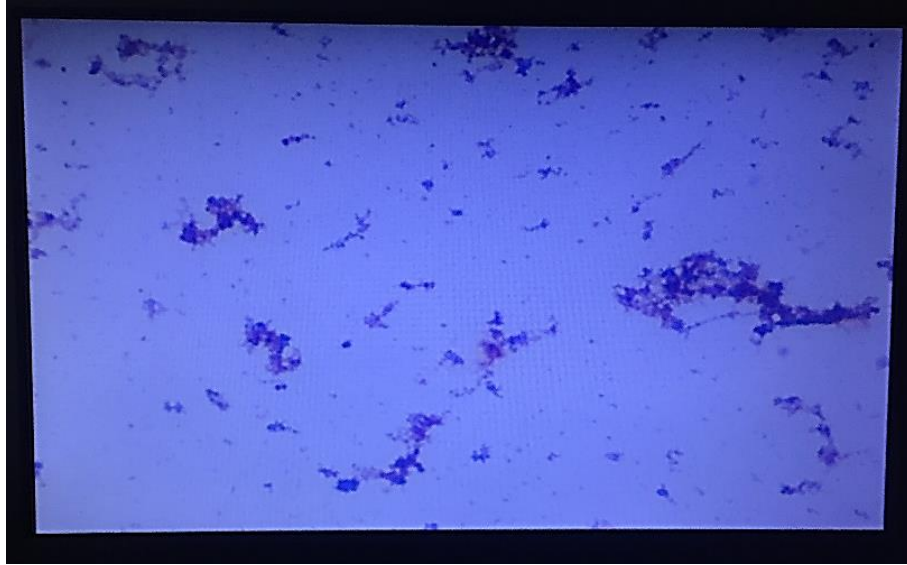
Elaboración: Autor



A) Incubación a 37°C B) Recipiente en donde se reactivó la cepa en microanaerobiosis

Fuente: Investigación

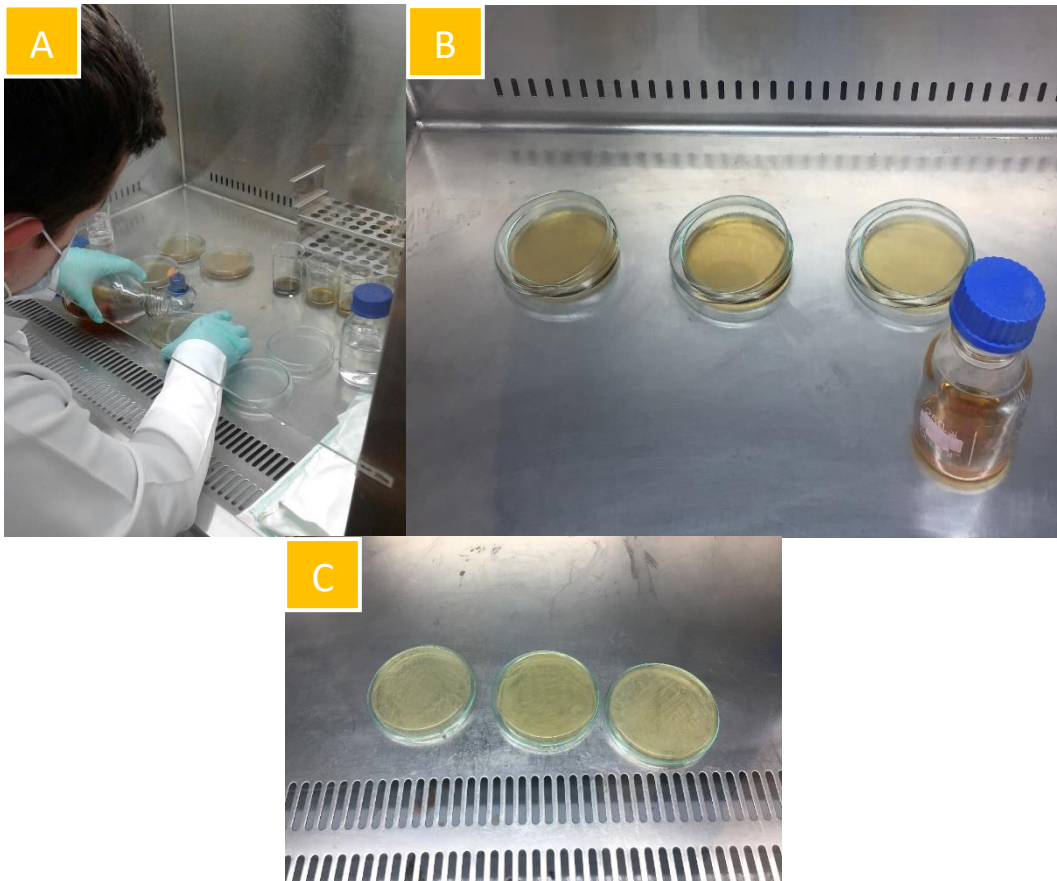
Elaboración: Autor



Tinción de Gram, cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 utilizada en la presente investigación

Fuente: Investigación

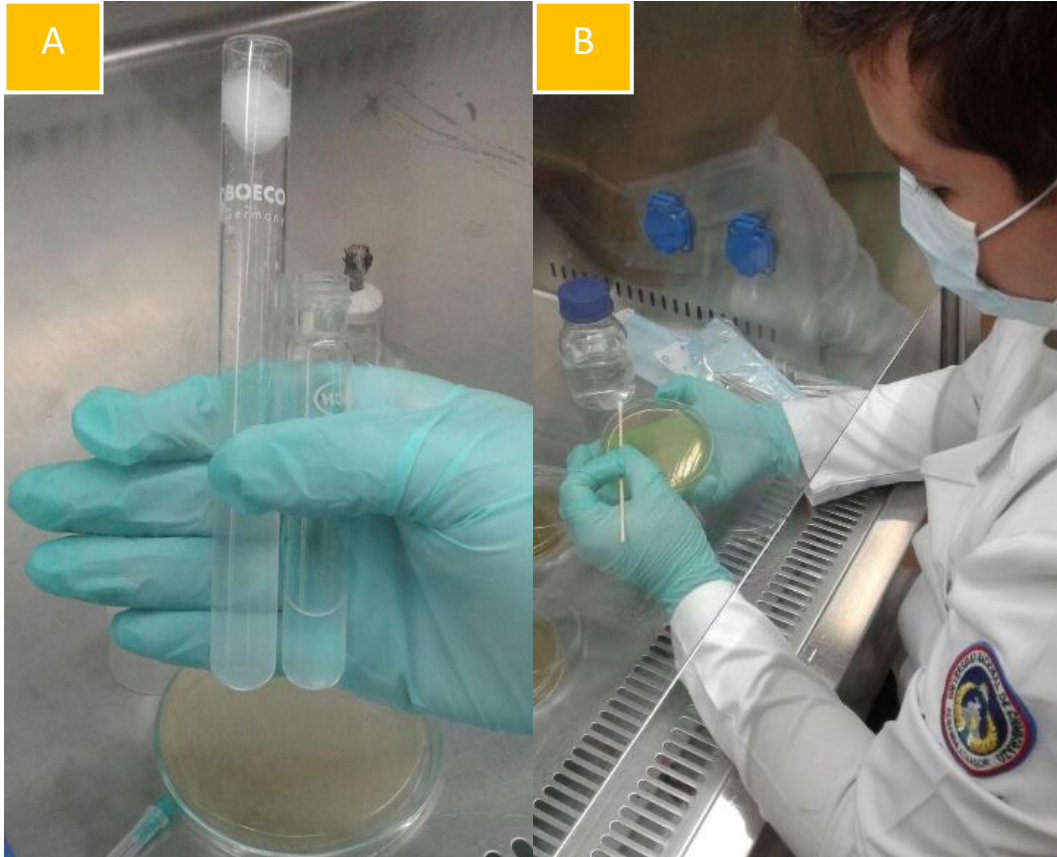
Elaboración: Autor



A) Preparación de Agar MRS en cajas Petri. B) Medios de agar MRS en etapa de gelificación C) Colonias jóvenes de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (24 horas posterior a la siembra)

Fuente: Investigación

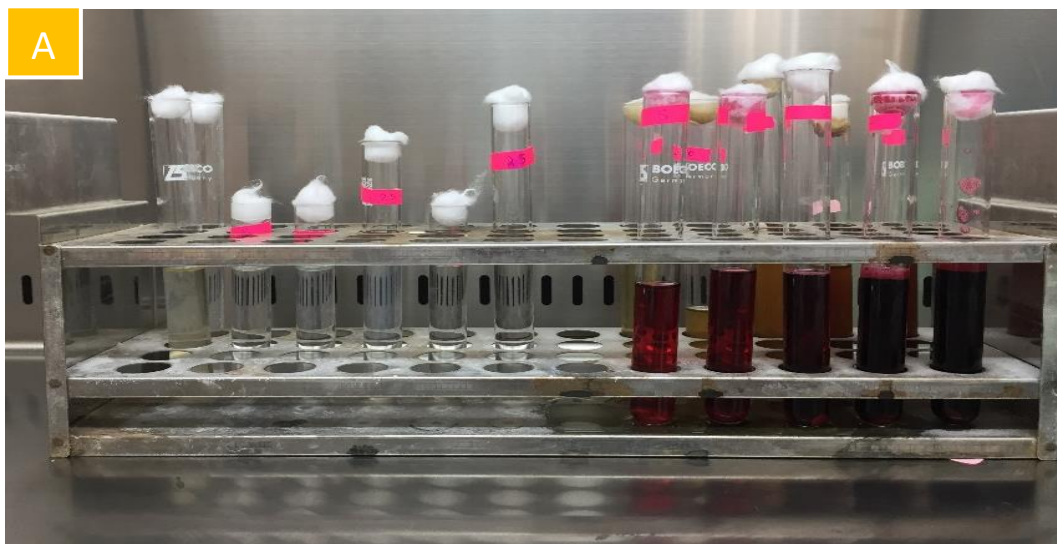
Elaboración: Autor

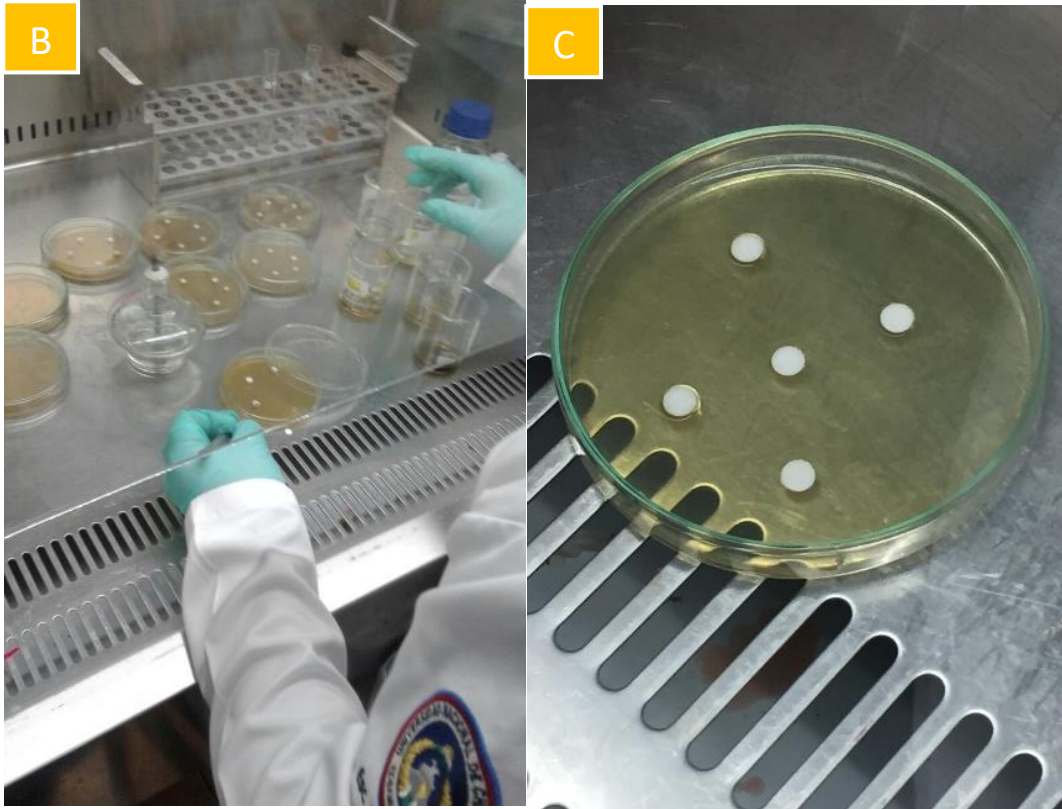


A) Comparación de Escala 05 Mc Farland. B) Siembra de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en agar MRS

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

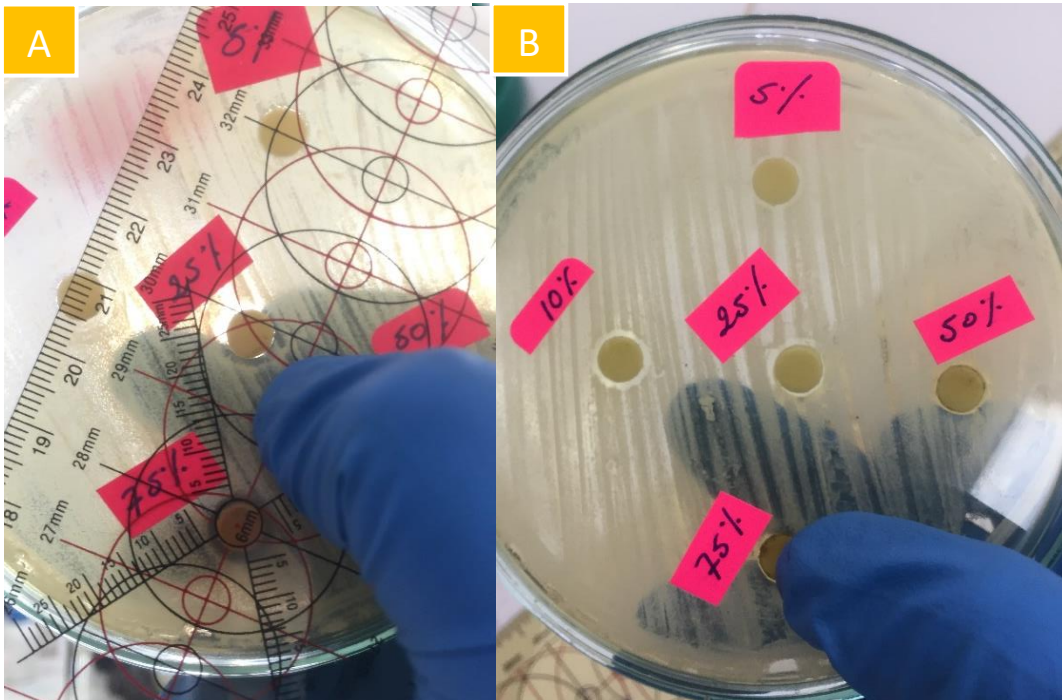




A) Preparación de Agar MRS en cajas Petri. B) Medios de agar MRS en etapa de gelificación C) Colonias jóvenes de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (24 horas posterior a la siembra)

Fuente: Investigación

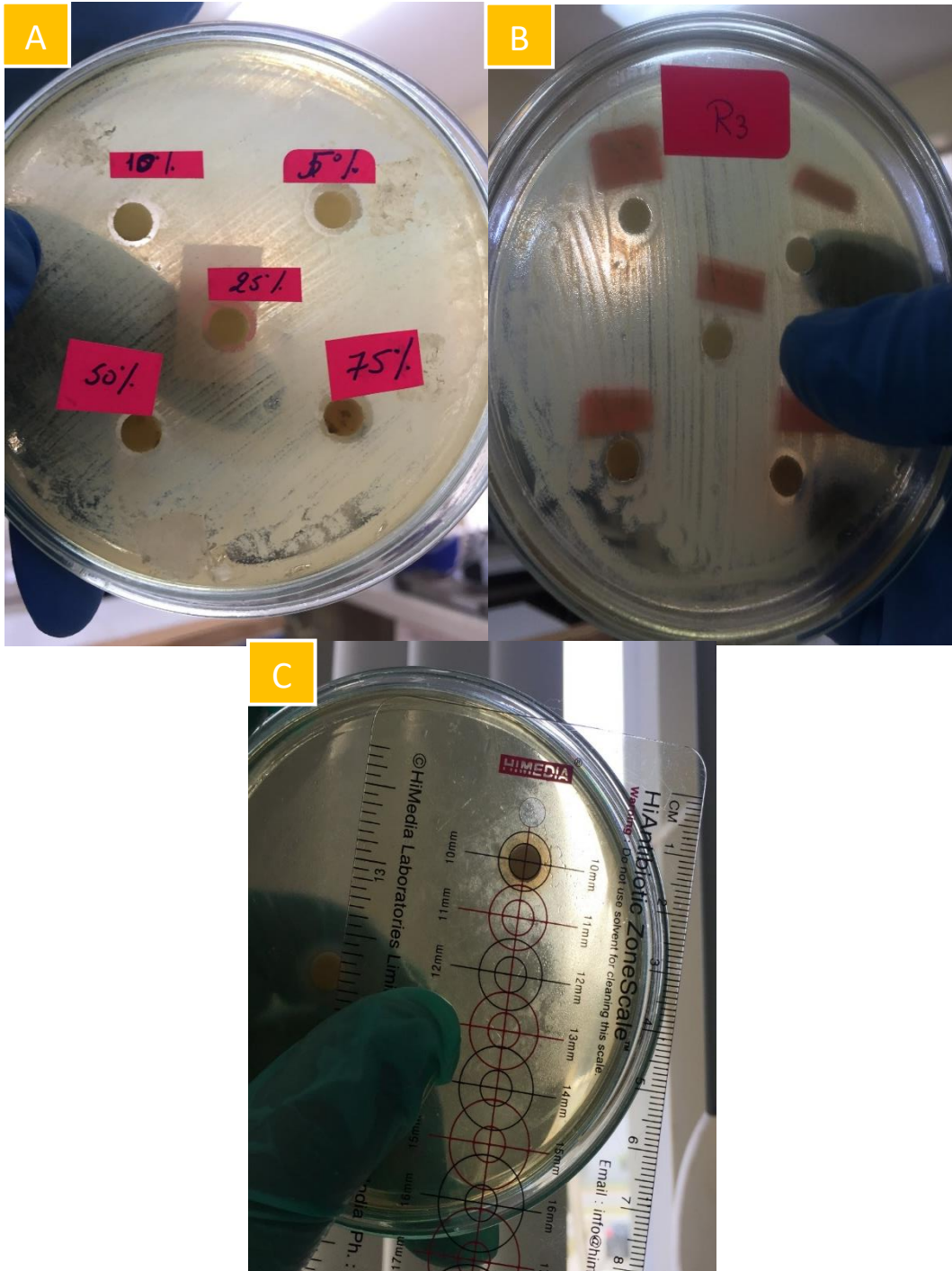
Elaboración: Autor



A) Medida halos de inhibición control negativo alcohol B) Caja Petri con control negativo de alcohol

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



A) Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de hojas de *Amaranthus hybridus* L B) Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de flores de *Amaranthus hybridus* L C) Halos de inhibición clorhexidina 2%

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Riobamba, 04 de Octubre del 2016

CERTIFICADO

Certifico que el señor **HENRY PAUL VALVERDE HARO**, con cedula de identidad N° 0603588021, egresado de la Facultad de Ciencias de la Salud, carrera Odontología, realizó distintos análisis en los Laboratorios de Control de Calidad correspondiente a su proyecto de tesis **“EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Amaranthus Hybridus L* (SANGORACHE) SOBRE LA CEPA DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS ATCC 4356”** en los meses de Agosto del 2016 a Octubre del 2016.

Es todo lo que puedo decir en honor a la verdad

Atentamente.

Ing. María Fernanda Rojas
**TÉCNICO (E) LABORATORIO
AGROINDUSTRIAL**

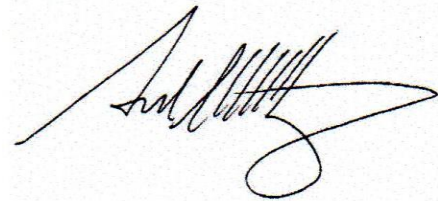


Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Lactobacillus acidophilus Catalog Number: 0243 Lot Number: 243-33 Reference Number: ATCC® 4356™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: N/A (Pellet is grown in MRS broth) Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2016/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2014/12/22
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types are present. The predominant colonies are medium to large, circular to slightly irregular, low convex, erose edge and rough; the other type is small, circular, convex, entire edge and smooth. Colonies are translucent and weakly alpha hemolytic.	Medium: CNA
Microscopic Features: Gram positive rods with rounded ends, occurring singly, in pairs, and in short chains.	Method: Gram Stain (1)

ID System: Vitek CBC (1)		Other Features / Challenges: Results
Phenotypic Features	Results	(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	
D-GALACTOSE	-	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	
Phenylalanine ARYLAMIDASE	+	
ARGININE GP	-	
PYRUVATE	-	
BETA-GALACTOSIDASE	+	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	
SUCCINATE alkalisation	-	
Tyrosine ARYLAMIDASE	+	
D-GLUCOSE	+	
BETA-GLUCOSIDASE	+	
D-MALTOSE	+	
D-MANNITOL	-	
BETA-XYLOSIDASE	-	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	
L-Proline ARYLAMIDASE	-	
LIPASE	-	
ALPHA-MANNOSIDASE	-	
D-MELEZITOSE	-	
UREASE	-	
SACCHAROSE/SUCROSE	+	
D-TREHALOSE	+	
CITRATE (SODIUM)	-	
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide	-	
L-LACTATE alkalisation	-	
ALPHA-GLUCOSIDASE	+	
D-SORBITOL	-	
ALPHA-GALACTOSIDASE	-	
Glycine ARYLAMIDASE	-	
D-MALATE	-	
D-RIBOSE	-	
MALTOTRIOSE	+	
L-GLUTAMINE	-	
Phenylphosphonate	+	
BETA-D-FUCOSIDASE	+	
COURMARATE	+	
2-Keto-D-Gluconate	-	
ESCULIN hydrolyse	+	
ELLMAN	-	
D-XYLOSE	-	



Brad Goskowicz, President
 AUTHORIZED SIGNATURE

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications

Microorganism Name: Lactobacillus acidophilus

Catalog Number: 0243

Lot Number: 243-33

Reference Number: ATCC® 4356™*

Purity: < 0.1% Total Pellet CFU

Recovery: N/A (Pellet is grown in MRS broth)

Passage from Reference: 4

Expiration Date: 2016/10/31

Release Information:

Quality Control Technologist: Carol J Stanoch

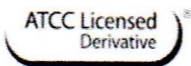
Release Date: 2014/12/22

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01