

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE ODONTOLOGÍA



Análisis *in vitro* del efecto antimicrobiano del *Plantago major L.* (Llantén)
frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433

Trabajo de investigación para la obtención del título de ODONTOLOGO

Autor

Br. Jairo Rolando Machado Herrera

Tutor:

Dra. Kathy Marilou Llori Otero

Riobamba – Ecuador

Año 2017

Página de revisión del tribunal

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: **Análisis in vitro del efecto antimicrobiano del *Plantago major L.* (Llantén) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433**, presentado por Jairo Rolando Machado Herrera, y dirigida por la Dra. Kathy Marilou Llori Otero, 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:

A las:16:00..... del día 25 del mes de Enero.....del año 2017

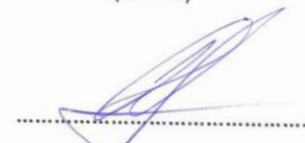
Kathy Llori
.....
Miembro del Tribunal (Nombre)


.....
(Firma)

Dra. Sandra Cruz
.....
Miembro del Tribunal (Nombre)


.....
(Firma)

Dr. Emilio Carranza
.....
Miembro del Tribunal (Nombre)


.....
(Firma)

VISTO BUENO DEL TUTOR

Riobamba 23 de Enero del 2017

Yo Dra. Kathy Marilou. Llori Otero en calidad de Tutor del Trabajo de Investigación realizado sobre “**Análisis in vitro del efecto antimicrobiano del *Plantago Major L.* (llantén) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433**” por el estudiante Jairo Rolando Machado Herrera estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de odontología, una vez corregido y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación, en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, por lo cual reúne los requisitos y méritos suficientes, remite la presente certificación de encontrarse apto para la defensa pública.



.....

Dra. Kathy Marilou. Llori O

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“Los derechos de autor y responsabilidad del contenido de este Proyecto de Investigación: Análisis *in vitro* del efecto antimicrobiano del *Plantago major L.* (Llantén) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 nos corresponde exclusivamente a: Br. Jairo Rolando Machado Herrera y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



.....

Br. Jairo Machado

CI: 0603564980

Autor

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser quien guía y fortalece mi vida, por permitirme seguir cumpliendo cada meta que me he propuesto, porque será él quien me seguirá motivando para seguir afrontando los obstáculos y adversidades que se puedan presentar en mi vida. A mis padres **Hernán Machado** y **Marcia Herrera** por apoyarme de manera incondicional durante toda mi vida, por depositar su confianza en mí y por inculcarme valores morales para realizarme como una persona de bien ante la sociedad. A mis hermanos **Paul Machado** y **Paola Machado** por apoyarme y darme su respaldo en cada meta que me las he trazado. A los docentes de la carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Chimborazo, por aportar con su semilla de conocimiento durante todo el proceso de mi formación universitaria, siendo así los pilares fundamentales en mi formación profesional. A mi tutor de tesis Dra. Kathy Llori, por ser mi ejemplo a seguir siendo un pilar muy importante durante todo este proceso, por su confianza, optimismo y sus importantes aportes para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico en primer lugar a Dios, quien me acompaña y guía toda mi vida, a mis padres; Hernán Machado y Marcia Herrera quienes con su esfuerzo y fortaleza han aportado con su granito de arena para poder culminar mi trabajo de investigación junto con mi carrera, gracias a su apoyo incondicional, amor y confianza a ser el motor y guía de mi vida. A mis hermanos Paul y Paola por su apoyo sincero, palabras de aliento, cariño y consejos brindados en cada paso de mi vida.

RESUMEN

El presente estudio de tipo observacional *in vitro*, tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del *Plantago major l.* (Llantén) sobre el *Enterococcus faecalis*. Los extractos se obtuvieron a partir de hojas frescas de Llantén de la cual se obtuvo extracto hidroalcohólico del principio activo totales procedentes de las hojas secas y tallos de esta planta la cual se procesó, mediante maceración alcohólica con alcohol etílico al 90 % y metanol puro y así su posterior evaporación del solvente con el empleo del rotavapor; una vez obtenidos los principios activos en los dos extractos disueltos en los solventes orgánicos (metanol y etanol) se procedió a disolverlos en DMSO (DIMETILSULFOXIDO) un gran disolvente orgánico encargado de potenciar dichos principios activos; por otro lado se realizó el cultivo de dicha bacteria con su respectiva reactivación y limpieza de la muestra para así obtenida una muestra óptima se procedió a realizar la prueba de sensibilidad *in vitro* llamada prueba de papel la cual se lo realizo por triplicado en cada extracto con diferente solvente. Como resultado se obtuvo que el extracto hidroalcohólico con solvente metanol si presento efecto antibacteriano sobre el *Enterococcus faecalis* mientras que el extracto hidroalcohólico con solvente alcohol etílico presento efecto nulo por lo tanto con estos resultados obtenidos se pueda dar un uso correcto de esta planta en contra de dicha bacteria.

Palabras clave: extracto hidroalcohólico, (Llantén *Plantago major l.*), *Enterococcus faecalis*

Abstract

The present in vitro observational study aimed to determine the antibacterial effect of *Plantago major* L. (Llantén) on the *Enterococcus Faecalis*. The extracts were obtained from fresh Llantén leaves from which hydroalcoholic extract of the total active ingredient were obtained from the dry leaves and stems of this plant which was processed by alcoholic maceration with 90% ethyl alcohol and pure methanol and Thus its subsequent evaporation of the solvent with the use of the rotative steam; After obtaining the active ingredients in the two extracts dissolved in the organic solvents (methanol and ethanol), a large organic solvent was dissolved in DMSO (DIMETHYLSULFOXIDE) in charge of enhancing said active principles; On the other hand, cultivating of this bacterium was carried out with the respective reactivation and cleaning of its sample, so when an optimal sample was gotten, the in vitro sensitivity test was carried out, called a paper test, which was done in triplicate in each extract with a different solvent.

The result of this process was that the hydroalcoholic extract with solvent methanol presented an antibacterial effect on the *Enterococcus faecalis* while the hydroalcoholic extract with solvent ethyl alcohol presented a nule effect. Therefore with these results gotten this plant could be used in a correct way against Said bacterium.

Key words: hydroalcoholic extract, Llantén (*platago major* L.), *Enterococcus faecalis*


SIGNATURE

Reviewed by: Maldonado, Ana
Language Center Teacher



INDICE

Contenido

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCION	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.3 PROBLEMA CIENTIFICO.....	3
1.4 JUSTIFICACION.....	4
1.5 HIPOTESIS.....	4
2 OBJETIVOS:	5
2.1 OBJETIVO GENERAL:	5
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	5
3 . MARCO TEORICO.....	6
<i>Plantago major</i> (Llantén).....	6
El Género <i>Enterococcus</i>	7
<i>Enterococcu. Faecalis</i>	7
Dimetil sulfóxido (dimetilsulfóxido, DMSO, CH ₃ SOCH ₃	8
4 METODOLOGIA	10
4.1 Tipo y diseño de la investigación:.....	10
4.2 Contexto temporal y geográfico.....	10
4.3 UNIVERSO:	10
4.4 MUESTRA:.....	10
4.5 VARIABLES:	10
4.6 TECNICA Y PROCEDIMIENTO:.....	10
5 RESULTADOS.....	12
5.1 DISCUSIÓN:	16
6 CONCLUSIONES:	17
8 BIBLIOGRAFIA:.....	19

9	ANEXOS:	21
12.1	FOTOS PROCEDIMIENTO.....	21
Anexo 1	Fotos de resultado alcohol etílico (sensibilidad nula):.....	31
12.2	Anexo 2: fotos de los resultados Metanol: (sensibilidad media).....	31
ANEXO 3:	32

1. INTRODUCCION

En muchas ocasiones para curar determinadas patologías que afectan la salud, se ha tenido que recurrir a ciertos procedimientos terapéuticos que se apartan de la medicina convencional. Hoy por hoy, esta alternativa médica experimenta un auge cada vez más creciente; sin embargo, éstas no son absolutamente nuevas, casi en su totalidad son los resultados de técnicas y procedimientos usados tradicionalmente. Desde la antigüedad el hombre ha usado las plantas como remedio de muchas de las enfermedades.¹

El *Plantago major L.* Es una herbácea perenne, de tallos subterráneos no ramificados. Popularmente conocida como “Llantén mayor”, “Llantén común” o “Llantén grande”. Por ser una planta de fácil localización; Además de esto, posee un potencial de comercialización enorme, gracias a sus propiedades antiinflamatoria, antibacteriana, astringente y antihemorrágica; también como cicatrizante de heridas, tanto interno como externo.^{2,3,4}

El compuesto de mayor relevancia es la aucubigemina (derivado de la aucubina) y se cree que es el responsable de la actividad antibacteriana de la planta. El género *Enterococcus* engloba un conjunto de especies morfológicamente semejantes a los estreptococos. Las más frecuentemente aisladas en clínica son *Enterococcus faecalis* los cuales causan infecciones muy diversas y poseen un creciente interés en el caso de los procesos oportunistas.⁵

Se asocian en parejas y cadenas cortas y si bien, su hábitat natural es el intestino, se han podido aislar a veces como microbiota normal en la mucosa bucal y dorso de la lengua. También se han descrito aislamientos de infecciones pulpo-periapicales y de bolsas periodontales⁵.

El factor principal asociado con los fracasos en el tratamiento endodóntico es la persistencia de la infección microbiana en el sistema de los conductos radiculares¹³. Los microorganismos implicados pueden haber sobrevivido a los efectos de la aplicación de los procedimientos biomecánicos que se realizan durante la ejecución de dicho tratamiento o, pueden haber invadido los conductos como consecuencia de las filtraciones que se suscitan en la corona de los dientes con tratamientos de conductos obturados^{6,7}.

Algunas investigaciones han reportado la presencia de biopelículas (biofilms) de *E. faecalis* en el sistema de conductos de dientes mono radiculares extraídos y, que habían sido obturados con cemento a base de Hidróxido de Calcio. La formación de la biopelícula constituye una evidencia contundente de que *E. faecalis* puede colonizar los conductos radiculares medicados^{8,9}

Las investigaciones microbiológicas de los últimos cinco años reflejan que en los fracasos endodóncicos hay una mayor prevalencia de las especies bacterianas *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* puede sobrevivir en condiciones ambientales en las que el pH es similar o superior a 11.5, valores similares a los que proporciona el hidróxido de calcio ¹⁰.

El dimetil sulfóxido (dimetilsulfóxido, DMSO, CH₃SOCH₃) Es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro, usado como disolvente orgánico industrial a partir de 1940, como criopreservante a partir de 1961 y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación). Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares.¹¹

El DMSO sirve también como acarreador de drogas o venenos; Descubierto por Saytzeff en 1866, el dimetilsulfóxido se obtiene como subproducto durante el procesamiento de pulpa de madera para la fabricación de papel.¹³ Es un solvente aprótico y altamente polar. Por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos como alcoholes, cetonas etc. Puede formar complejos en sistemas biológicos.¹¹

Lo que sorprendió por igual a científicos y químicos era la tremenda capacidad del líquido para disolver sustancias. La capacidad única del DMSO para penetrar los tejidos vivientes sin ocasionar daños significativos se relaciona con su estructura relativamente compacta y naturaleza polar así como también a su capacidad de aceptar enlaces de hidrógeno.¹¹

El DMSO se utilizó primero como agente farmacológico en 1962 y ganó fama como producto que podía aliviar el dolor y la inflamación en muchas condiciones, incluyendo aquellos que habían permanecido intratables por todos los otros métodos.¹¹

Los estudios iniciales habían revelado que podía aliviar el dolor, reducir la inflamación, impedir el crecimiento bacteriano, suavizar el tejido cicatrizado, mejorar el suministro sanguíneo, era un excelente relajante muscular, podía actuar como diurético y podía también mejorar la efectividad de otros agentes farmacológicos.¹¹

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad sabemos que las principales patologías bucales están determinadas por varios factores; siendo uno de ellos y tal vez el más importante la presencia de microorganismos en nuestra cavidad oral siendo uno de los más comunes y de gran importancia como lo es el *Enterococcus faecalis* encontrado en infecciones periodontales y en mayor cantidad en fracasos de tratamientos endodónticos

Por lo tanto se hace necesario dar a conocer que existe un método de receta terapéuticas populares, basadas en *Plantago major* (Llantén) el cual se puede utilizar en forma empírica para la prevención y tratamiento curativo de las enfermedades bucales que se vean comprometidas por dicha bacteria

1.3 PROBLEMA CIENTIFICO

¿Cuál es el efecto antimicrobiano del *Plantago major* (Llantén) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433

1.4 JUSTIFICACION

El gran uso de la medicina popular tradicional y en especial el uso de plantas con propiedades curativas están siendo cada vez más utilizadas en la odontología de hoy en día ; las enfermedades de la cavidad bucal han sido tratadas durante mucho tiempo de manera empírica con aparente efectividad sin embargo existe escasa información que dé validez científica a su uso, por lo que con ésta investigación se pretende contribuir a aumentar dicha información.

El siguiente trabajo se justifica debido a que se va analizar la posibilidad de utilizar una planta (llantén) como uso alternativo medicinal la cual permitirá a los profesionales combatir la presencia de este microorganismo y así evitar el establecimiento de diferentes patologías orales.

1.5 HIPOTESIS

El extracto de *Plantago major L.* (Llantén) tiene efecto antimicrobiano sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 19433

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Plantago major L.* (Llantén) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, in vitro

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar cuál de los extractos de *Plantago major L.* (Llantén) disueltos en solventes orgánicos presenta mayor sensibilidad sobre una cepa de *Enterococcus faecalis*.
2. Establecer la diferencia de inhibición del extracto de *Plantago major L.* (Llantén) a diferentes concentraciones sobre una cepa de *Enterococcus faecalis*.

3 . MARCO TEORICO

En muchas ocasiones para curar determinadas patologías que afectan la salud, se ha tenido que recurrir a ciertos procedimientos terapéuticos que se apartan de la medicina convencional. Hoy por hoy, esta alternativa médica experimenta un auge cada vez más creciente; sin embargo, éstas no son absolutamente nuevas, casi en su totalidad son los resultados de técnicas y procedimientos usados tradicionalmente. Desde la antigüedad el hombre ha usado las plantas como remedio de muchas de las enfermedades¹¹.

Por tal motivo, en la actualidad, existe un contraste en cuanto a los avances alcanzados en la creación de nuevos medicamentos; ya que la utilización de la medicina natural cobra cada vez más defensores y ejecutores, debido fundamentalmente a las formas naturales de curación y a la carencia de efectos secundarios de estas terapias. Por lo tanto, surgen iniciativas científicas de establecer un tratamiento fitoterapéutico que involucre: la selección, dosificación, vía de administración y recomendaciones para el paciente acerca de la alternativa natural^{12, 13}.

***Plantago major* (Llantén)** Anteriormente, los indígenas mesoamericanos y suramericanos despertaron el interés por el uso de las plantas medicinales que han contribuido notablemente en el avance de modernas terapias, con el empleo de todo tipo de hierbas para las dolencias y sanar las heridas; además utilizaron palillos de oro cuidadosamente para mantener la higiene bucal.¹⁴

En tal sentido, a partir de la década de los 60, a nivel mundial empezaron a utilizarse plantas medicinales como el “colirio” y el *Plantago major*, empleadas en zonas rurales, para afecciones cutáneas y del aparato digestivo y para inflamaciones poco agudas de la garganta o de la cavidad bucal. Por lo tanto éstas plantas han influido notablemente en la cultura humana, desarrollando un gran interés en cuanto a la adquisición de conocimientos y bases kinesiológicas para el tratamiento, en la curación de enfermedades principalmente a nivel bucal^{15, 16, 17}

El *Plantago major* es una herbácea perenne, de tallos subterráneos no ramificados. Popularmente conocida como “Llantén mayor”, “Llantén común” o “Llantén grande”. Por ser una planta de fácil localización; Además de esto, posee un potencial de comercialización enorme, gracias a sus propiedades antiinflamatoria, antibacteriana, astringente y antihemorrágica; también como cicatrizante de heridas, tanto interno como externo. El compuesto de mayor relevancia es la aucubigemina (derivado de la aucubina) y se cree que es el responsable de la actividad antibacteriana de la planta¹⁷

Es importante resaltar que su actividad sanadora no se le atribuye a un sólo compuesto, sino a la interacción de varias sustancias y de su regulación mutua. Las investigaciones realizadas sobre *Plantago major* han revelado la presencia de mucílagos, pectinas,

flavonoides, taninos, un glucósido denominado aucubósido (aucubina) y otro llamado catapol. Tanto las hojas como las flores y el tallo poseen el glucósido aucubina. La aucubigemina (principio activo), proviene de sustancias inactivas como polímeros de este compuesto y de la aucubina¹⁸.

El Género *Enterococcus* engloba un conjunto de especies morfológicamente semejantes a los estreptococos. Las más frecuentemente aisladas en clínica son *Enterococcus faecalis* las cuales ausan infecciones muy diversas y poseen un creciente interés en el caso de los procesos oportunistas. Se asocian en parejas y cadenas cortas y si bien, su hábitat natural es el intestino, se han podido aislar a veces como microbiota normal en la mucosa bucal y dorso de la lengua. También se han descrito aislamientos de infecciones pulpo-periapicales y de bolsas periodontales¹⁹.

El factor principal asociado con los fracasos en el tratamiento endodóntico es la persistencia de la infección microbiana en el sistema de los conductos radiculares¹³. Los microorganismos implicados pueden haber sobrevivido a los efectos de la aplicación de los procedimientos biomecánicos que se realizan durante la ejecución de dicho tratamiento³ o, pueden haber invadido los conductos como consecuencia de las filtraciones que se suscitan en la corona de los dientes con tratamientos de conductos obturados²⁰.

Diversos estudios han revelado que la microbiota de los dientes con fallas en el tratamiento endodóntico, difieren de la microbiota encontrada normalmente en los conductos de dientes no tratados. La microbiota que se encuentra en los dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico es predominantemente anaerobia facultativa y Gram positiva, siendo *E. faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia²⁰.

Enterococcus faecalis es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. Esta bacteria ha atraído recientemente la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periodontales y periapicales persistentes²⁰.

Una característica notable de *E. faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de Cloruro de Sodio), temperaturas extremas (15-60°C) y puede resistir además a la acción de colorantes como Azul de Metileno al 0,1%.²⁰

Esta capacidad de resistencia por parte de *E. faecalis* en microambientes tóxicos, está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento endodóntico y en los cuales los nutrientes son limitados, añadiéndose a esta situación el hecho de que algunos agentes antimicrobianos, pudieran influir en que esta especie permanezca en los conductos de los dientes afectados. Debido a su excelente acción bactericida, el Hidróxido de Calcio es el agente antimicrobiano que se emplea de elección como medicamento intrarradicular²⁰.

Un aspecto importante relacionado con la actividad antimicrobiana del Hidróxido de Calcio es su capacidad para mantener el pH del medio (conducto radicular obturado) en valores cercanos a 12. Algunos estudios han demostrado la supervivencia de *E. faecalis* en el ambiente alcalino generado por el Hidróxido de Calcio. Se ha sugerido que la resistencia de *E. faecalis* al Hidróxido de Calcio, permite a esta bacteria sobrevivir en presencia del medicamento y proliferar cuando la acción de este finaliza. Ello resulta en la colonización e infección del conducto radicular²⁰.

Algunas investigaciones han reportado la presencia de biopelículas (biofilms) de *E. faecalis* en el sistema de conductos de dientes monorradiculares extraídos y, que habían sido obturados con cemento a base de Hidróxido de Calcio. La formación de la biopelícula constituye una evidencia contundente de que *E. faecalis* puede colonizar los conductos radiculares medicados²⁰.

Cuando esta especie crece en las biopelículas, puede ser hasta mil veces más resistente a la acción de los antimicrobianos que cuando se halla como bacteria planctónica (suspendida en un medio líquido y no adherida a ninguna superficie). Si la formación de biopelículas que contienen *E. faecalis* ocurre *in vivo*, ello pudiera considerarse como un mecanismo que permite a este microorganismo resistir al tratamiento antimicrobiano²⁰.

También se han realizado otras investigaciones dirigidas a aclarar el papel que juegan los factores de virulencia de *E. faecalis*, en la colonización por parte de esta bacteria en un medio tan pobre en nutrientes, como el conducto radicular medicado. La adhesión a la superficie de la dentina constituye un paso esencial que determina el potencial patógeno de este microorganismo, en el conducto radicular medicado.²¹

Puesto que la dentina contiene colágeno y otras proteínas, se sugiere que las proteasas sintetizadas por *E. faecalis*, así como la proteína de unión al colágeno (Ace) pudieran participar o por lo menos influir en la adhesión bacteriana, y por lo tanto permitir que la bacteria colonice el conducto radicular²¹

La identificación de cepas de enterococos se puede realizar bien sea por métodos convencionales o, mediante el empleo de sistemas de identificación rápida utilizando las galerías para estreptococos Rapad Strep (Biomerieux), pudiéndose obtener resultados similares en lo que a frecuencia de detección de especies de *Enterococcus* se refiere, por lo que ambos métodos son ampliamente recomendados para identificar a estos microorganismos²².

Las investigaciones microbiológicas de los últimos cinco años reflejan que en los fracasos endodóncicos hay una mayor prevalencia de las especies bacterianas *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* puede sobrevivir en condiciones ambientales en las que el pH es similar o superior a 11.5, valores similares a los que proporciona el hidróxido de calcio²².

Dimetil sulfóxido (dimetilsulfóxido, DMSO, CH₃SOCH₃) Es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro, usado como disolvente orgánico industrial a partir de 1940, como criopreservante a partir de 1961 y como un medicamento (reduce el dolor y la

inflamación). Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares.²²

El DMSO sirve también como acarreador de drogas o venenos; Descubierto por Saytzeff en 1866, el dimetilsulfóxido se obtiene como subproducto durante el procesamiento de pulpa de madera para la fabricación de papel. Es un solvente aprótico y altamente polar. Por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos como alcoholes, cetonas etc. Puede formar complejos en sistemas biológicos.²²

Lo que sorprendió por igual a científicos y químicos era la tremenda capacidad del líquido para disolver sustancias. La capacidad única del DMSO para penetrar los tejidos vivientes sin ocasionar daños significativos se relaciona con su estructura relativamente compacta y naturaleza polar así como también a su capacidad de aceptar enlaces de hidrógeno.²²

Esta combinación de propiedades le permite asociarse con el agua, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, sustancias iónicas y otros constituyentes de los sistemas vivientes. Para entender las posibles funciones del DMSO en los sistemas biológicos, de importancia primordial es su capacidad de remplazar algunas de las moléculas de agua asociadas con los constituyentes celulares.²²

El DMSO se utilizó primero como agente farmacológico en 1962 y ganó fama como producto que podía aliviar el dolor y la inflamación en muchas condiciones, incluyendo aquellos que habían permanecido intratables por todos los otros métodos. Los estudios iniciales habían revelado que podía aliviar el dolor, reducir la inflamación, impedir el crecimiento bacteriano, suavizar el tejido cicatrizado, mejorar el suministro sanguíneo, era un excelente relajante muscular, podía actuar como diurético y podía también mejorar la efectividad de otros agentes farmacológicos.²²

Adicionalmente, el dolor de esguinces, torceduras, quemaduras, artritis, aún las de huesos fracturados, eran eliminados por completo. El DMSO mata virus y hongos y trabaja maravillosamente contra las cataratas, lesiones deportivas, escleroderma, miastenia gravis y tuberculosis. En personas con el síndrome de Down, el retardo mental se ha disminuido considerablemente²²

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo y diseño de la investigación:

El estudio corresponde a una investigación observacional experimental, ya que se trata de un análisis in vitro en el cual tenemos la necesidad de demostrar cual es el efecto antimicrobiano del Llantén (*Plantago major*) frente a una cepa de *Enterococcus faecalis* donde el investigador manipula las condiciones la investigación.

4.2 Contexto temporal y geográfico

El siguiente trabajo de investigación va a ser realizado en el laboratorio clínico de la Universidad Nacional De Chimborazo, en la ciudad de Riobamba en los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre del año 2016

4.3 UNIVERSO:

Enterococcus Faecalis ATCC 19433

4.4 MUESTRA:

Una cepa de *Enterococcus faecalis*

4.5 VARIABLES:

Independiente: Efecto antimicrobiano de *Plantago major* L. (Llantén)

Dependiente: Bacteria *E. faecalis* ATCC 19433

4.6 TECNICA Y PROCEDIMIENTO:

Recolección de muestras

- **Obtención de la planta:**

Primero se obtuvo las hojas frescas de *Plantago major* las cuales fueron compradas en los principales mercados de la ciudad de Riobamba en una proporción de 4 kilos

Procesado de la muestra

- **Lavado y corte de la planta:**

Después de lavarla se procedió a cortar en forma general la planta a manera de cuadritos para así dejar durante 7 días en condiciones expuestas a luz solar hasta que se seque la planta

- **Molida de la planta:**

Una vez obtenidas las partes secas de la planta se procedió a moler las mismas las cuales se guardara en dos recipientes diferentes para así colocar los dos solventes orgánicos

- **Colocación de los solventes orgánicos:**

Se procedió a la colocación de los dos solventes (Alcohol etílico y metanol) uno en cada frasco y se esperó el tiempo de maceración que fue por 7 días.

- **Filtrado de las muestras:**

Se procedió al filtrado de las muestras de los dos frasco para lo cual utilizaremos papel filtro el cual colocaremos en un embudo los cuales pasaron a dos recipientes as pequeños.

- **Concentración:**

Posteriormente se procedió a la evaporación de las dos muestras filtradas con la ayuda del Buche Rotavapor obteniéndose, de esta manera los principios activos totales para después obtener el análisis de dichas muestras y analizar la sensibilidad que presento ante la cepa de *E. Faecalis*.

Preparación de bacterias de interés clínico:

La bacteria se obtuvo gracias al laboratorio de genética y biología molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo ya que ahí si se cuenta con una cepa de *Streptococcus faecalis* en refrigeración.

Reactivación de la cepa estándar ATCC: Esta cepa ATCC se mantuvo en condiciones de refrigeración a (-20 °C) hasta su reactivación bajo las condiciones de crecimiento que ella requiere

- **Activación:** para la activación colocamos en dos tubos de ensayo 5 ml de solución fisiológica en cada uno, luego se procedió a colocar 20 µl de *E. faecalis* en cada una de ellas.
- **Siembra para la determinación de la sensibilidad antibacteriana:**
Después con un hisopo estéril lo embebimos de los tubos de la bacteria y lo cultivamos esparciéndolo en dos cajas Petri ya previamente preparadas con 15 ml de medio agar TSA y lo dejamos incubando a 37°C por 24 horas
- Una vez ya obtenidas las muestras ya sembradas incubadas se procedió a coger una muestra de ellas con un palillo y se lo sembró en un medio de cultivo líquido TSB en cantidad de 50ml y se lo incubo por 24 horas a 37°C.
- **Lavado de la muestra:**

Una vez activada la bacteria se procedió al lavado de la muestra lo cual consistió en dividir en 4 tubos plásticos para centrifugarlos por 8 minutos a 300 revoluciones por minuto después sacar el producto con una pipeta con 100 µl y volver a colocar en medio agar

liquido TSB de tubo a tubo y volverlo así a centrifugar para luego después de varias repeticiones tener una muestra limpia para su posterior prueba.

- Se procedió a tomar las dos muestras de la planta y se la coloco en dos tubos ependorf en una de cantidad de 1,5ml para luego diluirlo en DMSO (dimetil sulfoxido) y esperar q se disuelva completamente y dividir en 5 concentraciones (25,20,25,10,5) mezclándolo con agua esteril.

Antibiograma (Prueba de sensibilidad):

- Se procedió a colocar 1000 μ l de la bacteria en un tubo con 5ml de solución fisiológica estéril de la cual fue extraído 100 μ l que se colocó en 3 cajas Petri preparadas previamente en un medio de cultivo agar TSA y se procedió a frotar con una hoz estéril de manera homogénea por todo el recipiente
- Se procedió a colocar 5 discos de papel filtro distribuidos en sentido horario en los cuales fueron puestos 25 μ l de cada concentración de mayor a menor de la planta ya procesada.
- Este procedimiento se lo realizó dos veces ya que la muestra de la planta estaba procesada en dos tipos diferentes de solventes los cuales se dejó incubar las 6 cajas Petri por 24 horas a 37°C

5 RESULTADOS

Los resultados se evaluaron a través de un antibiograma el cual es utilizado para conocer la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes sustancias como lo son las dos muestras de llantén que en 24 h se la obtuvo y se procedió a la lectura de resultados.

Medición de resultados:

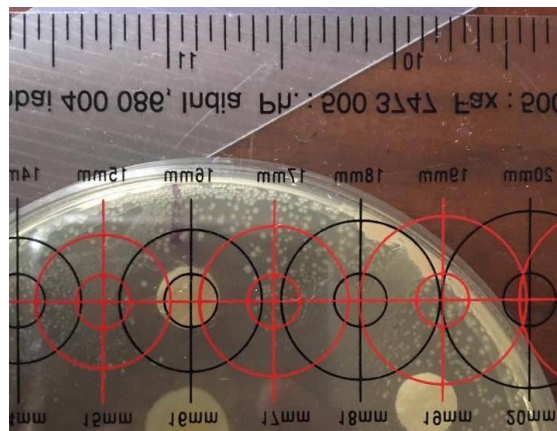


Figura 27: medición de los halos de inhibición

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

EFEECTO ANTIMICROBIANO

Para determinar el efecto antimicrobiano se consideró el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento microbiano para lo cual se establece los siguientes parámetros:

SIMBOLOGIA	DIAMETRO
Nula (-)	Inferior o igual a 8 mm
Sensibilidad límite (+)	9 a 14 mm
Sensibilidad media (++)	15 a 19 mm
Sumamente sensible (+++)	Igual o superior a 20 mm

Tabla 1. Índice del diámetro de los halos de inhibición

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. María Fernanda Ríos

HALOS DE INHIBICION

En la determinación de los halos de inhibición se utilizó el extracto de llantén en concentraciones de 5%, 10%, 15%, 20% y 25%; en metanol y etanol frente a la cepa de *Enterococcus faecalis*

EXTRACTO DE LLANTEN EN METANOL

Se realizó tres repeticiones en las cuales se pudo identificar que los valores más altos del extracto del llantén en metanol pertenecen a las concentraciones al 20% y al 25%, lo cual según los diámetros obtenidos de los halos posee una sensibilidad media.

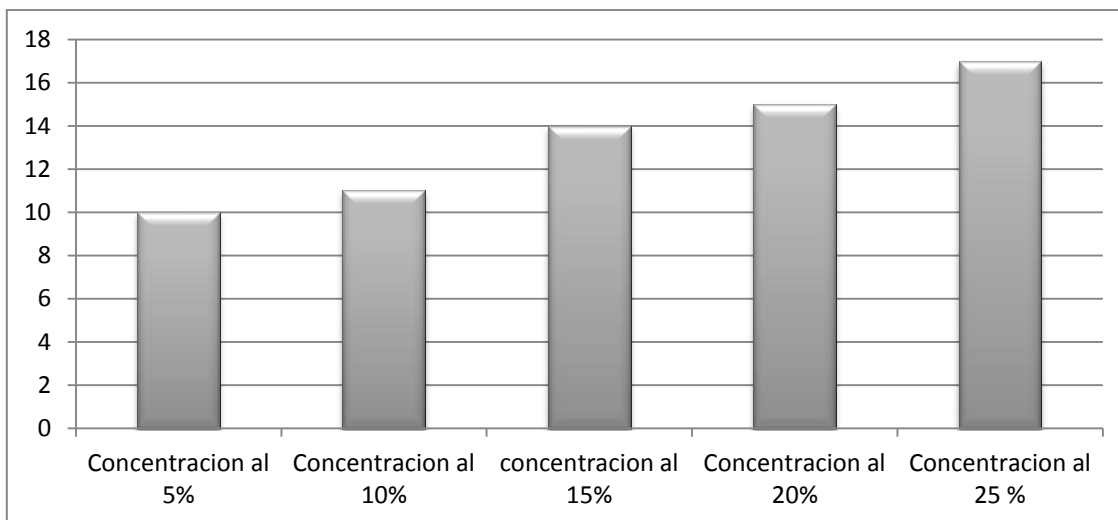


Grafico 1. Promedio de diámetros de los halos de inhibición en Metanol

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

EXTRACTO DE LLANTEN EN ETANOL

Se realizó tres repeticiones en las cuales se pudo identificar que ningún valor de las concentraciones del extracto del llantén etanol presento respuestas lo cual según los diámetros obtenidos de los halos posee una sensibilidad nula.

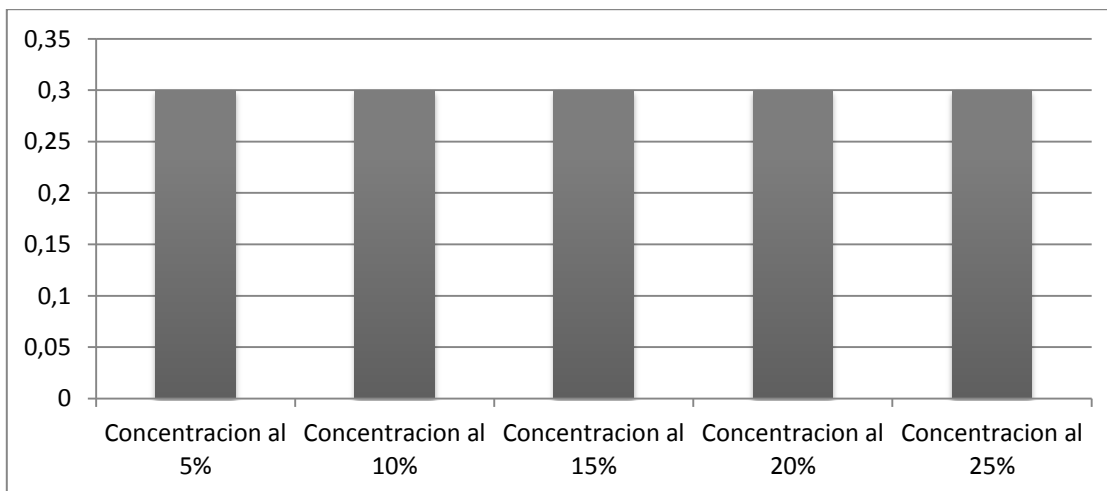


Grafico 2. Promedio de diámetros de los halos de inhibición en Etanol

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	836,333 ^a	5	167,267	78,508	,000
Intersección	1984,533	1	1984,533	931,463	,000
Extracto de llantén	790,533	1	790,533	371,046	,000
Concentraciones	45,800	4	11,450	5,374	,003
Error	51,133	24	2,131		
Total	2872,000	30			
Total corregida	887,467	29			

a. R cuadrado = ,942 (R cuadrado corregida = ,930)

Tabla 1. Resultados del ANOVA de los halos de Inhibición, según Metanol y Etanol

Fuente: Elaboración realizada en Software IBM Statistics SPSS versión 22

Se realizó el análisis de los extractos de *Plantago major L.* (llantén) en solventes orgánicos (metanol y etanol) y en diferentes concentraciones, según el modelo Anova Bifactorial, dónde los factores fueron: solventes orgánicos y las concentraciones y la variable de respuesta los diámetros de los halos.

Los resultados nos muestran que existe diferencia altamente significativa de los diámetros de los extractos *Plantago major L.* entre los solventes orgánico metanol y etanol, así mismo también existe diferencia altamente significativa en las diferentes concentraciones del extracto.

5.1 DISCUSIÓN:

Los extractos obtenidos mediante maceración alcohólica del plantago mayor l. (llantén) en concentración de 20 y 25 % ug/ml disueltos en metanol demostraron tener mayor propiedades antibacterianas, in vitro sobre la cepa de streptococcus faecalis que conforma parte de la micro biota oral. El comportamiento de los extractos en términos de tamaño de halos de inhibición fue de 9 a 14 mm presentando un control de sensibilidad media mientras que al hacer el control con etanol en las mismas concentraciones no se obtuvieron resultados positivos de gran relevancia por lo cual presento una sensibilidad nula

Arteaga S, 2016. Demostró la efectividad del gel de llantén como terapia coadyuvante en la mejoría de la recuperación de la salud periodontal se la pudo evidenciar con la disminución de los sacos periodontales comprobando así sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas²³. Estoy de acuerdo con este artículo ya que el extracto hidroalcohólico del llantén en nuestra investigación también presento un efecto antimicrobiano positivo frente a *E. Fecalis* bacteria que ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periodontales.

Rodríguez Y, 2014. demostró que la mayoría de los Odontólogos utilizan el Plantago Mayor como terapia alternativa en inflamaciones orales, como gingivitis, aftas y periodontitis²⁴. Estoy de acuerdo con este artículo ya que nos da una alternativa terapéutica muy efectiva, en nuestra investigación el extracto hidroalcohólico del plantago mayor al ser utilizados con los protocolos apropiados para el tratamiento de dichas afecciones se presentaría también como una novedosa y prometedora terapia alternativa

Alvarado V. 2010 demostró que los halos de inhibición de extractos hidroalcohólicos con Plantago mayor presentaron actividad antimicrobiana positiva en concentraciones de 20 y 25 % frente a varias bacterias importantes de la boca, los diámetros de sus halos estuvieron entre los rangos de 8mm a 12 mm presentando así una sensibilidad limite²⁵. Estoy de acuerdo con este estudio ya que en nuestra investigación el extracto hidroalcohólico de plantago mayor al ser potencializado por medio de solventes orgánicos en las concentraciones de 20 y 25 % tuvo mayor diámetro de halo de inhibición que estuvo en el rango de entre 15 a 17mm presentando una sensibilidad media

6 CONCLUSIONES:

1. Al realizar el análisis por triplicado se pudo constatar que el extracto disuelto en metanol si presento actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* dando así como resultado una sensibilidad media
2. En la comparación de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico disuelto en metanol se pudo verificar que las concentraciones de 20% y 25 % fueron las que presentaron la mayor actividad antibacteriana positiva sobre la cepa de *Enterococcus faecalis*.
3. Después de haber realizado el antibiograma se verifico que el extracto disuelto en etanol presento el mismo resultado de actividad antimicrobiana negativo en todas sus concentraciones dando así como resultado una sensibilidad nula.

7 RECOMENDACIONES:

- Se recomienda incentivar a los estudiantes de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad Nacional de Chimborazo a continuar con estos estudios con el fin de profundizar el aprendizaje durante el ciclo de estudio universitario.
- Fomentar el conocimiento de los estudiantes dentro del desarrollo investigativo desde sus inicios de carrera para así poder garantizar futuros profesionales competitivos en la sociedad

8 BIBLIOGRAFIA:

1. . Grosso L. El uso popular de las plantas medicinales en Uruguay. Associazione Italiana di Zootecnia Biologica y biodinamica. 2010; 6
2. Moreno A, Cañada A, Antúnez J, Díaz C, Pineda A. Uso de la fitoterapia en 3 clínicas estomatológicas de Santiago de Cuba. MEDISAN, 2011;15(4):489.
3. Blanco B, Saborio A, Garro G. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial del Plantago Major (Llantén Mayor). Abril-Junio 2008; 21(2):17-24..
4. Madaleno I. Cuadernos Geográficos. Etno-farmacología e n Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Granada, España 2003. pp. 61-95
5. Siquiera JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth fail. Int Endod J 2001; 34: 1-10
6. Facklam R, Sahm D, Martins L. *Enterococcus*. En: Murray P, Barone, Pfaller M, Tenover F, Tenover R editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th edition. American Society of Microbiology 1999: 297-305.
7. Curvelo M, Jiménez A. Plantas medicinales tradicionales y su uso en la cultura Wayu. Aprendizaje de la medicina tradicional y el uso de plantas medicinales típicas de la zona a los alumnos de la sede cerritos. [Tesis]. 2013.
8. 10. Corredor P. Odontología Holística, dentistas que aplican tratamientos personalizados sin dolor. 2009 [Enero de 2012].
9. Ssundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. Int Endod J 1991; 24: 119-25.
10. Sabag V, Pinto J, Vía S, Camacho M. Formulación de un fitomedicamento con actividad gastroprotectora a partir de extractos de llantén (Plantago major). Biofarbo, 2010;18(2):44 – 52.
11. Avendaño E, Dávila O. Consumo de Chimó en niños de edad escolar en la población de los Nevados, estado Mérida. 2006.
12. Vanaclocha B, Cañigüeral S. Fitoterapia Vademecum de prescripción. 4 ed. Barcelona: Editorial Masson, 2003:1001-15.
13. Pacho J, Martínez A, Fernández V, Ceruto I. Farmacología en atención estomatológica en menores de 19 años. Revista Cubana de Estomatología. 46 (2). Recuperado en el año 2009.
14. Rodríguez A. León M. Hernández A. Barranco J. Revista cubana, plantas medicinales. Actividad antifúngica in vitro de una crema de Plantago Major. 1996;1(3):9-12.
15. George S, Kishen A, Song K. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. J Endod 2005; 31: 867-72.

16. Duggan J, Sedgley C. Biofilm formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. J Endod 2007; 33: 815-8.
17. Pinheiro ET, Gomes Bpfa, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Sousa-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 100-3
18. Liébana Ureña J. Microbiología Oral. 2 ed. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.; 2002. Sjogren U, Fidgor D, Spandbey I,
19. Dahlen G, Samuelson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 309-12.
20. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006; 32: 93-8
21. Hubble TS, Hatton JF, Nallaparedy SR, Murray BE, Gisepsie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, *Ace*, on adhesion to dentin. Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 121-6
22. Hernández C, Gómez M, Muñoz F, Zamora F, Villaroel M, Medina G. Identificación de cepas de enterococos utilizando el método convencional y el sistema automatizado ATB-Plus. Boletín Soc Venezol Microbiol 1999; 19: 58-60
23. Arteaga S, Dávila L, Gutiérrez R, Efectividad del gel de manzanilla y Llantén como coadyuvante en la periodontitis crónica, revistas.saber.ula.ve, Venezuela 2016
24. Rodríguez Y, Conocimiento sobre el uso del plantago mayor como terapia alternativa en lesiones inflamatorias bucales, RevVenezInvestOdont IADR, Venezuela 2014
25. Alvarado V. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano in vitro de Plantago major L, Erythroxyllum novogranatense, Plowman var truxillense y Camellia sinensis sobre bacterias de importancia estomatológica, Odontol. Sanmarquina, Perú 2010; 13(2): 21-25

9 ANEXOS:

12.1 FOTOS PROCEDIMIENTO



Figura 1: *Plantago major* (Llantén)

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 2: Lavado del *Plantago major* (Llantén)

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 3: Secado del *Plantago major* (Llantén)

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 4: Molida de la planta
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 5: molida de la planta
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 6: Envasado del *Plantago major* (Llantén) molido
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 7: colocación de los solventes orgánicos
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 8: colocación de los solventes orgánicos
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 9: filtrado del *Plantago major* (Llantén)
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 10: muestras filtradas de los dos solventes

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 11: colocación de las muestras en el rotavapor

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 12: procesado y macerado de las muestras

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

- **Muestras ya procesadas:**



Figura 13: extractos ya procesados de Llantén

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

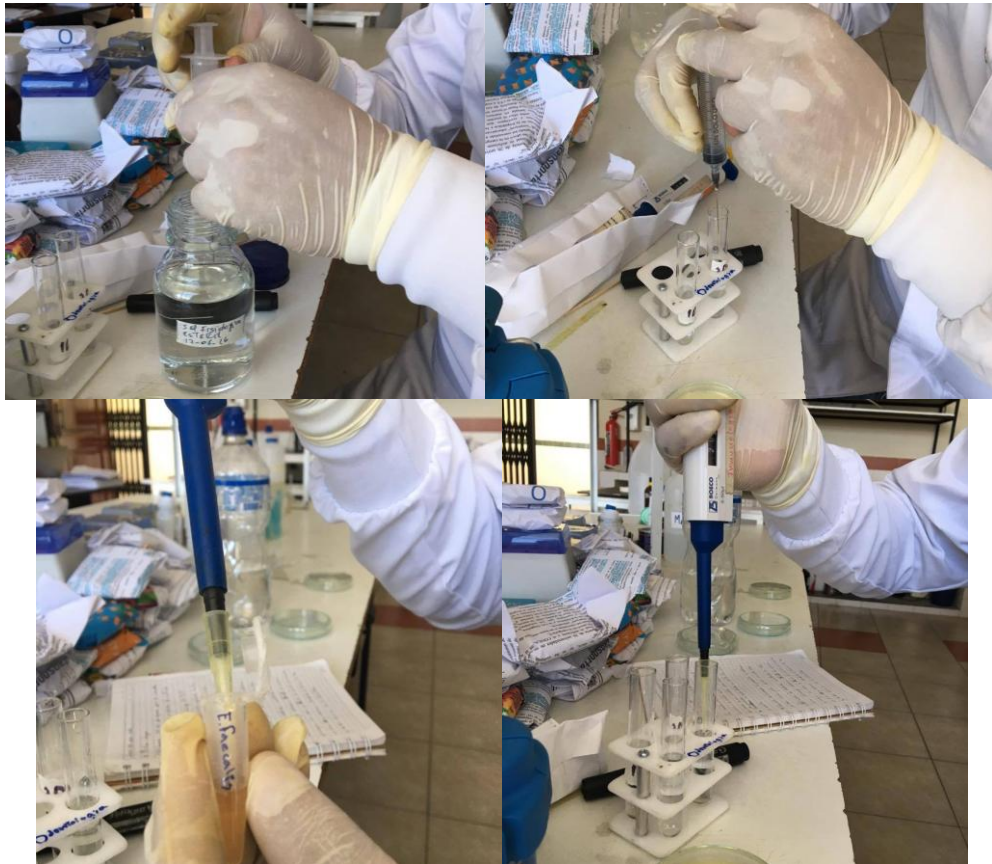


Figura 14: activación del *Enterococcus Faecalis*

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 15: siembra de la bacteria en el medio de cultivo agar TSA
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 16: Colocación de las cajas en la incubadora
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor

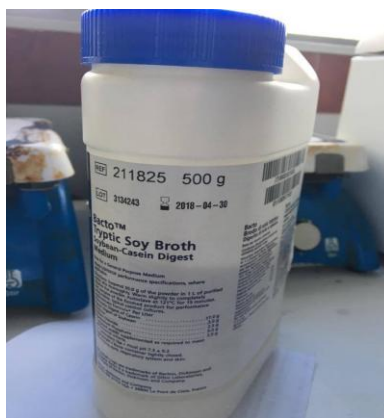


Figura 17: medio de cultivo TSB
Fuente: Investigación
Elaboración: Autor



Figura 18: Cultivo en medio de agar TSB

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

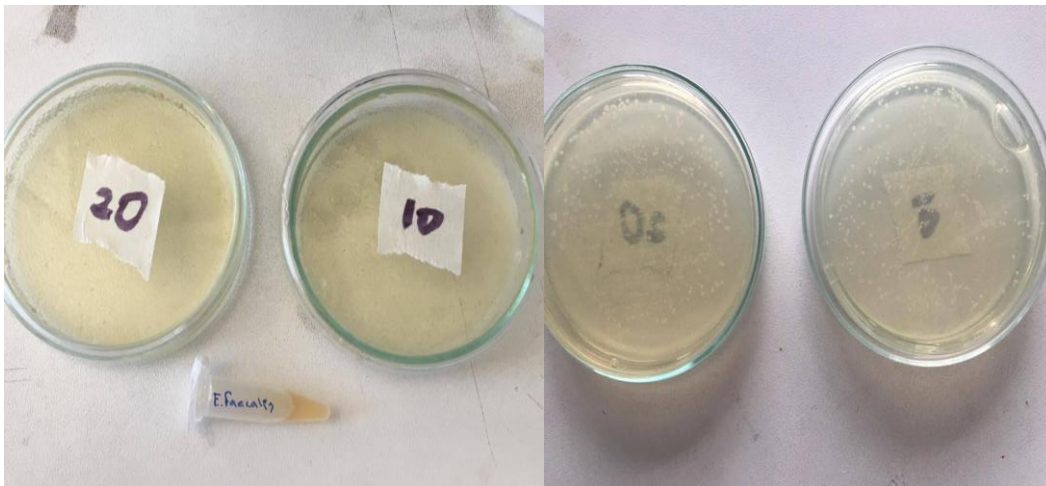


Figura 19: muestras sembradas de *Enterococcus Faecalis*

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 20: lavado de la muestra

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 21: centrifugación de la muestra

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 22: muestras diluidas en DMCO

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 23: cultivo de cada muestra en tres cajas con agar TSA

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 24: Colocación del papel filtro y extractos de la planta

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Prueba con el extracto de llantén diluido en alcohol etílico

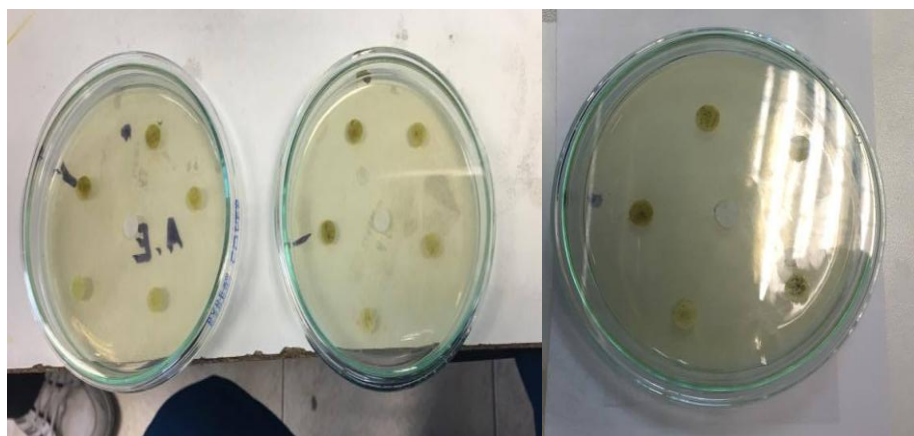


Figura 25: prueba por triplicado en etanol

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Prueba con el llantén diluido en metanol:

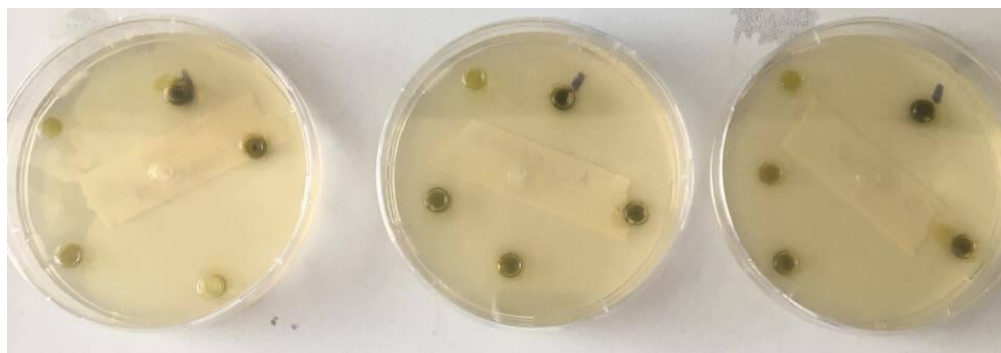
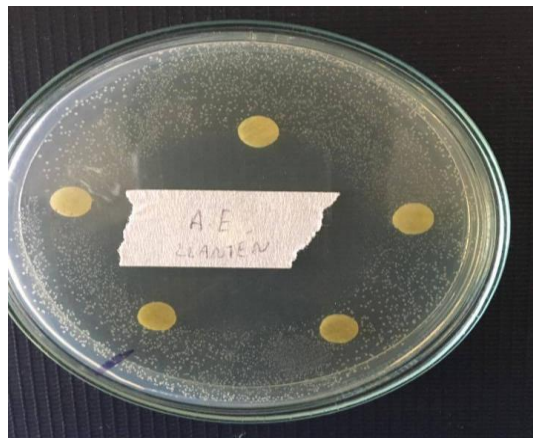
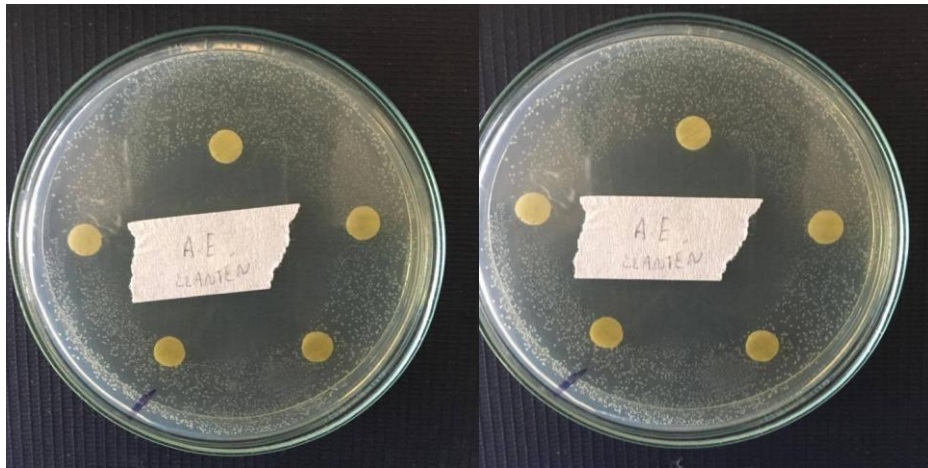


Figura 26: prueba por triplicado en metanol

Fuente: Investigación

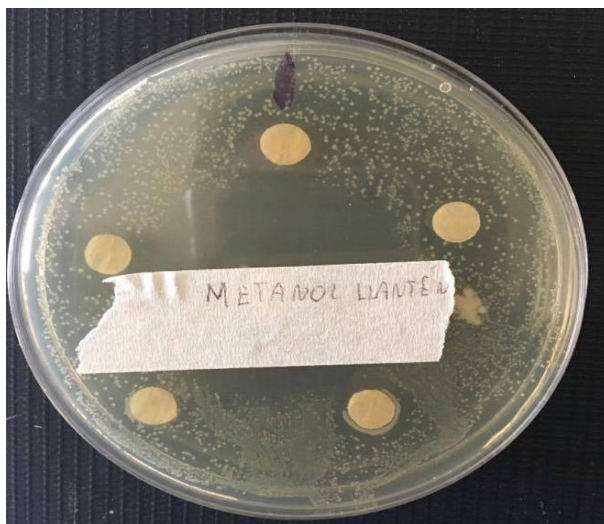
Elaboración: Autor

Anexo 1 Fotos de resultado alcohol etílico (sensibilidad nula):



12.2 Anexo 2: fotos de los resultados Metanol: (sensibilidad media)





ANEXO 3:

CONCENTRACION	DIAMETRO
5 %	(-) 0.3mm
10 %	(-) 0.3mm
15%	(-) 0.3mm
20 %	(-) 0.3mm
25 %	(-) 0.3mm

Tabla 2. Resultados del diámetro de los halos de inhibición en Etanol

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

CONCENTRACION	DIAMETRO
5 %	10 mm
10 %	11 mm
15%	14 mm
20 %	15 mm
25 %	17 mm

Tabla 3. Resultados del diámetro de los halos de inhibición en Metanol

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor