

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*

Guadalupe Isabel Suarez Castro

Liceth Valentina Rey Ortiz

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Odontología

San José de Cúcuta

2023

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*

Guadalupe Isabel Suárez Castro

Liceth Valentina Rey Ortiz

Asesor científico

Adiel Alberto Vásquez Quijano

Bacteriólogo y Lic. Biología y química

Asesor metodológico

Blanca Lynne Suárez G.

Odontóloga MSc. Ciencias Básicas Médicas

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Odontología

San José de Cúcuta

2023

Dedicatoria

Le dedico el resultado de este trabajo a mi familia. Principalmente, a mis padres y a mi hermana, que fueron motivación y apoyo constante en este proceso para seguir adelante superando cualquier adversidad. Gracias por sembrar en mí, principios y valores sólidos, por enseñarme el verdadero significado de la perseverancia, disciplina y empeño para alcanzar este sueño, en el que son los protagonistas.

Liceth Valentina Rey Ortiz

La presente tesis se la dedicó con todo mi amor a mi familia, en especial a mi padre que en el cielo con su espíritu me guía y me mantiene firme para seguir adelante y su recuerdo está latente día a día; este logro es en tu honor. Te amo, y espero que estés orgullosa de mí.

Guadalupe Isabel Suárez Castro

Agradecimientos

Primeramente, doy gracias a Dios por permitirme que este sueño se hiciera realidad, por darme la sabiduría, fortaleza y valentía a lo largo del camino para nunca desvanecer. A mis padres y hermana por ser el pilar fundamental, por brindarme su apoyo desde el primer momento, agradezco a mis directores de tesis Blanca Lynne Suárez por ser guía primordial en este proceso y a Adiel Alberto Vásquez Quijano, persona de gran excelencia y sapiencia, que, a pesar de sus quebrantos de salud, acompañó excepcionalmente esta investigación.

Este proceso no ha sido fácil, pero con el amor, la motivación y el apoyo recibido, hizo que el camino fuera menos difícil para alcanzar esta meta.

Liceth Valentina Rey Ortiz

Ante todo, agradezco a Dios por darme la fuerza, la persistencia, y el poder para cumplir esta gran meta. A mis padres y a mis hermanos, en especial a mi hermana Carolina que siempre me ha brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis sueños académicos como personales. Ellos son los que, con su cariño, amor y mucho esfuerzo me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado los recursos necesarios para poder continuar con mis estudios, a ellos mil gracias, los amo con todo mi ser.

También quiero darles las gracias a mis docentes en especial al Dr. Adiel Alberto Vásquez Quijano y a la Dra. Blanca Lynne Suárez Gélvez por su dedicación, por trasmitirme todos los conocimientos necesarios para poder escribir este proyecto.

Guadalupe Isabel Suárez Castro

Resumen

Cocos nucifera, posee amplia actividad antimicrobiana, reconocido en medicina herbaria como medicamento para tratar enfermedades por sus propiedades medicinales. *Streptococcus mutans* es un microorganismo anaerobio facultativo, involucrado en procesos cariosos.

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *S. mutans*.

Materiales y métodos: Estudio experimental *in vitro*. Se extrajo aceite esencial por arrastre de vapor, utilizando un sistema soxhlet con agua destilada como diluyente, se realizaron diluciones del 5% al 100% del aceite esencial. Se utilizó cepa de referencia de *S. mutans* ATCC®25175 sembrada en agar sangre 5%. La sensibilidad se evaluó con el método de difusión en agar (Kirby–Bauer), con formación de halos de inhibición ≥ 18 mm. Se determinó concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y dosis letal 50% (DL50), partiendo del patrón de turbidez 0.5 de la escala de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml.

Resultados: Se obtuvieron evaluando el grado de sensibilidad de *S. mutans* a concentraciones entre el 5% y el 100% del aceite esencial de *C. nucifera*. Concentraciones superiores al 50% del aceite esencial de *C. nucifera* generaron halos de inhibición ≥ 18 mm sobre *S. mutans*, se encontró una CMB de 145,6 mg/dl y una DL50 de 91,0 mg/dl. A partir de una dilución del 30% se observaron halos de inhibición ≥ 15 mm.

Conclusión: El aceite esencial de *Cocos nucifera* tiene efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, *Cocos nucifera*, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida, dosis letal 50.

Abstract

Cocos nucifera has broad antimicrobial activity, recognized in herbal medicine as a medicine to treat diseases due to its medicinal properties. *Streptococcus mutans* is a facultative anaerobic microorganism, involved in carious processes.

Objective: Determine the antibacterial effect of *Cocos nucifera* essential oil against *S. mutans*.

Materials and methods: *In vitro* experimental study. Essential oil was extracted by steam drag, using a Soxhlet system with distilled water as diluent, dilutions from 5% to 100% of the essential oil were made. Reference strain of *S. mutans* ATCC®25175 seeded on 5% blood agar was used. Sensitivity was evaluated with the agar diffusion method (Kirby-Bauer), with the formation of inhibition zones ≥ 18 mm. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and 50% lethal dose (LD50) were determined, based on the 0.5 turbidity pattern of the McFarland scale, equivalent to 1.5×10^8 UFC/ml.

Results: They were obtained by evaluating the degree of sensitivity of *S. mutans* to concentrations between 5% and 100% of the essential oil of *C. nucifera*. Concentrations greater than 50% of the essential oil of *C. nucifera* generated inhibition zones ≥ 18 mm on *S. mutans*, a MBC of 145.6 mg/dl and an LD50 of 91.0 mg/dl were found. From a 30% dilution, inhibition zones ≥ 15 mm were observed.

Conclusion: *Cocos nucifera* essential oil has an antibacterial effect on *S. mutans*.

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Cocos nucifera*, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, lethal dose 50.

Tabla de contenido

Introducción	12
Problema	13
Planteamiento del problema	13
Formulación del problema	15
Objetivos	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Marco teórico y referencial	17
Técnicas de extracción del aceite de coco	19
<i>Streptococcus mutans</i>	26
Factores de virulencia del <i>Streptococcus mutans</i>	27
Caries dental	31
Capacidad inhibitoria del aceite de <i>cocos nucifera</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i>	35
Pruebas de sensibilidad microbiana	38
Diseño metodológico	41
Tipo de investigación	41
Población de estudio	41
Población	41
Muestra	41

	8
Criterios de inclusión y exclusión	41
Criterios de inclusión	41
Criterios de exclusión	41
Variables	42
Variables dependientes	42
Variables independientes	42
Hipótesis	42
Hipótesis nula	42
Hipótesis alterna	42
Materiales y métodos	42
Análisis estadístico	48
Resultados	49
Discusión	53
Conclusiones	56
Recomendaciones	57
Referencias bibliográficas	58
Anexos	66

Lista de figuras

Figura 1. Montaje de destilación por arrastre de vapor.	26
Figura 2. Factores de virulencia de <i>Streptococcus mutans</i> .	31
Figura 3. Presencia de halo de inhibición de <i>S. mutans</i> en solución concentrada de <i>aceite esencial de Cocos nucifera</i> .	50

Lista de tablas

Tabla 1. Halos de inhibición de la concentración mínima inhibitoria.	50
Tabla 2. UFC de <i>S. mutans</i> en soluciones de <i>Cocos nucifera</i> (CMB).	51
Tabla 3. UFC de <i>S. mutans</i> en soluciones de <i>Cocos nucifera</i> (DL50).	52

Lista de anexos

Anexo A. Ficha técnica base de agar sangre.	66
Anexo B. Ficha técnica caldo tioglicolato.	68
Anexo C. Ficha técnica de la activación de <i>Streptococcus mutans</i> .	71
Anexo D. Evidencia fotográfica.	73

Introducción

Cocos nucifera pertenece a la familia *Arecaceae*, se originó en el sureste de Asia y también en las islas del Índico y el Pacífico. Esta planta se ha utilizado durante mucho tiempo para tratar una amplia gama de dolencias humanas en Ayurveda, ha sido reconocido en la medicina herbaria como un medicamento para tratar enfermedades debido a su rico contenido de fibra, minerales y vitaminas con alto valor nutricional, así como también por sus excelentes propiedades antifúngicas, antivirales, antibacterianas y antiinflamatorias. (Bukhari et al., 2019).

Estudios evidencian el potencial antibacteriano del aceite de coco contra varias cepas del género *Streptococcus* especialmente *S. mutans*, siendo una de las especies involucradas en el proceso carioso. El potencial cariogénico de *S. mutans* radica en tres propiedades principales, la capacidad de sintetizar grandes cantidades de polímeros de glucano extracelulares a partir de sacarosa, la capacidad de transportar y convertir una variedad de carbohidratos en ácidos orgánicos y la capacidad de crecer bajo estrés ambiental, especialmente a pH bajo. (Lemos et al., 2019)

Debido a la importancia que tiene la acción antibacteriana del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *S. mutans*, sustentados en estudios previos y teniendo en cuenta la amplia variedad de propiedades curativas que presenta este aceite esencial, se propone la presente investigación, con el fin de determinar el efecto antibacteriano de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*, contribuyendo de esta manera en la prevención de la caries dental, ya que es un problema de salud pública y buscando así nuevas alternativas en la utilización de productos de origen natural que puedan servir como una opción para el manejo de esta patología oral.

Problema

Planteamiento del problema

La fitoterapia es el estudio de la utilización de hierbas que tienen potencial terapéutico, cuyo conocimiento se transmite de generación en generación, y se considera una alternativa para el cuidado de la salud en odontología y medicina. El *aloe vera*, la caléndula, la copaiba, la papaína, el propóleo, la granada, se utilizan terapéuticamente, así también como analgésicos la manzanilla y la malva que han demostrado tener potentes propiedades antiinflamatorias; en relación a las características anteriormente mencionadas, estos agentes a base de hierbas deben considerarse como una alternativa en el tratamiento de enfermedades bucodentales ya que tienen las características que se necesitan para mejorar la salud oral durante el proceso patológico, con fácil acceso. (Bohneberger et al., 2019)

La caries dental es una de las causas más prevalentes de pérdida de dientes en niños y adultos. La cavidad oral forma un entorno de nicho único para los microorganismos, muchos de los cuales se acumulan en la superficie para formar el biofilm dental, un agente causal que puede fermentar los carbohidratos para producir ácido y dañar el esmalte, es una de las principales causas de la caries dental. *Streptococcus mutans*, *Lactobacilos*, *Actinomyces spp.* y algunas otras bacterias anaerobias se consideran los principales agentes cariogénicos. (Qiu et al., 2019). *Streptococcus mutans* es una bacteria anaerobia facultativa Gram positiva que habita en la cavidad oral y puede fermentar una variedad de azúcares. (Djais et al., 2019).

El descuido de la salud oral resulta costoso y no está al alcance de todas las comunidades. Si bien, la caries dental es una enfermedad que se produce por una combinación de factores, en

primer lugar, el factor económico, y en segundo, la presencia de *Streptococcus mutans*, siendo el más importante, por lo que se requieren opciones terapéuticas de origen natural. (Sin et al., 2021)

Los aceites esenciales (EO) son una clase de productos naturales con propiedades medicinales, que incluyen actividades antimicrobianas, antisépticas, antiinflamatorias y antioxidantes. Estos compuestos se describen como una mezcla de productos volátiles producidos como metabolitos secundarios a partir de plantas aromáticas. El aceite esencial puede afectar la biosíntesis celular de los microorganismos, inhibiendo la síntesis de proteínas o la división, y estimulando la sensibilidad de las especies a distintas concentraciones de oxígeno, lo que provoca un retraso en el crecimiento o la muerte celular. (Ferreira et al., 2021). La aplicación de aceite es un tratamiento Ayurvédico tradicional practicado primero en la antigua India para mejorar la salud oral, trata más de treinta enfermedades diferentes, además de aportar muchos beneficios para la salud bucal, como promover la salud de las encías, así como reducir la inflamación, el sangrado, corregir los síntomas de xerostomía y labios agrietados, reducción de la halitosis, mejoramiento de la higiene bucal y fortalecimiento de los músculos de la cavidad oral. (Woolley et al., 2020).

Muchas plantas se encuentran en el entorno y son utilizadas para la salud humana, la nutrición y la medicina. El coco (*Cocos nucifera*), también conocido como el árbol de la vida, se considera fundamental debido a propiedades medicinales. (Kaned et al., 2021). El aceite de coco contiene ácidos grasos de cadena media, vitaminas y antioxidantes, por lo tanto, es único en comparación con la mayoría de otros aceites, que se componen principalmente de ácidos grasos de cadena larga. (Ahmed et al., 2020). Woolley habla sobre los ácidos grasos de cadena media de los cuales el 50% son ácido láurico, conocido por sus propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, siendo eficaz contra muchas afecciones y procesos orales. (Seher et al., 2018) (Woolley et al., 2020). Estudios *in vitro* previos usando modelos de biopelícula han demostrado

propiedades antimicrobianas del aceite de coco contra *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Se ha evidenciado que la extracción y aplicación del aceite ayuda a prevenir infecciones orales y trata problemas sistémicos al eliminar toxinas y bacterias del torrente sanguíneo a través de las membranas mucosas. (Matangkasombut et al., 2022).

Dado que *Streptococcus mutans* es uno de los microorganismos más virulentos y determinantes que contribuyen a la formación de caries dental, se ha demostrado que el aceite de coco en el ámbito de la salud oral tiene propiedades antibacterianas, antimicrobianas y antifúngicas que ayudan a inhibir este patógeno. Por lo tanto, se busca sustentar la evidencia científica que compruebe que el aceite esencial de *Cocos nucifera* tiene efectos antibacterianos contra *Streptococcus mutans*.

Formulación del problema

La patología oral más prevalente a nivel mundial es la caries dental, la cual sigue siendo un problema de salud pública que está asociada con diversos microorganismos, pero en especial con la presencia de *Streptococcus mutans*, siendo el principal motivo de consultas odontológicas. Los tratamientos tradicionales no son la única opción, para su tratamiento existe una gran variedad de plantas medicinales que han demostrado ser efectivas, por lo cual se busca emplear compuestos naturales y de esta manera lograr reducir la incidencia de caries dental mediante sustancias poco utilizadas en el ámbito de la salud. Teniendo en cuenta de que existen pocas investigaciones que sustenten la efectividad del aceite esencial de *Cocos nucifera* y sus excelentes propiedades frente a dicho microorganismo, lleva a plantear el siguiente interrogante: ¿Tiene efecto antibacteriano el aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*?

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*.

Objetivos Específicos

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans in vitro*.

Identificar la dosis letal media (DL50) del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans in vitro*.

Encontrar la concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans in vitro*.

Marco teórico y referencial

Los aceites vegetales se obtienen principalmente de semillas de plantas y sus productos incluyen glicéridos de ácidos grasos de especies vegetales. Pueden contener pequeñas cantidades de otros lípidos como fosfolípidos, sustancias insaponificables y ácidos grasos libres que se encuentran naturalmente en aceites o grasas. (Furtado et al., 2020)

Cocos nucifera pertenece a la familia de las palmeras *Arecaceae*, el hábitat original de esta planta es el sudeste asiático (Filipinas, Indonesia, Malasia y las islas de los océanos Índico y Pacífico). (Bukhari et al., 2019). Entre las propiedades físicas del aceite de coco, este se presenta como un líquido incoloro a 30 °C o más, se endurece a 25°C, es de color blanco. Sin refinar tiene un punto de humeo de 170 °C, mientras que refinado tiene un punto de humeo de 232 °C. El aceite de coco, cuando se mezcla con agua y se agita, crea una mezcla blanca y homogénea, sin mezclar, el aceite de coco no se disolverá en agua. (Ng et al., 2021). Se destaca también por sus importantes propiedades antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antivirales y antiinflamatorias. Es útil en el tratamiento de trastornos fisiológicos por la presencia de compuestos como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos, que ayudan como antidepresivos, antiparasitarios, antidiabéticos, protectores renales, protectores cardiovasculares, antipalúdico, hepatoprotector, antiséptico, antisensibilizante, antitumoral y analgésico. (Bukhari et al., 2019).

El árbol de coco (*Cocos nucifera*) se considera una planta multifuncional por la alta variedad de productos que se pueden explorar, lo que lleva al reconocimiento en todo el mundo como un importante recurso vegetal para toda la humanidad. Se cultiva en 90 países, utilizando la fruta principalmente para la producción de aceites vegetales, los principales derivados del coco son comercializados internacionalmente. El aceite de coco es un producto de alto valor agregado y se destaca entre sus diversas aplicaciones en la industria jabonera y alimenticia, por tener larga

vida útil y se utiliza en productos de panadería y alimentos procesados, productos farmacéuticos y cosméticos. Este aceite destaca en el mercado como posible complemento en el tratamiento de la obesidad. (Furtado et al., 2020)

El aceite de coco se compone principalmente de ácido láurico y monolaurina que son grasas saturadas, ambos ácidos grasos son efectivos contra bacterias Gram positivas, virus y hongos. Según Kaned et al. afirman que los compuestos como la vitamina E, la provitamina A, los polifenoles y los fitoesteroles, son los encargados de sus propiedades anticonvulsivas, anticancerígenas, antihistamínicas y antidiabéticas. (Kaned et al., 2021)

El aceite de coco es rico en ácidos grasos saturados (SFA), especialmente ácidos grasos de cadena media (MCFA), consta de SFA con 6 a 12 cadenas de carbono. Los principales ácidos grasos de cadena media (AGCM) del aceite de coco son el ácido láurico (47,0-50,0 %), el ácido caprílico (8,00-9,00 %), ácido cáprico (5,00-7,0 %) y ácido caproico (0,80-0,95 %). Los MCFA también se absorben rápidamente y se convierten en energía porque cruzan fácilmente la membrana mitocondrial sin moléculas transportadoras, por lo que se metabolizan rápidamente en el hígado. La monolaurina, un derivado del ácido láurico, es el principal responsable de los efectos funcionales y terapéuticos del coco. Además, el VCO es ampliamente preferido por su potencial fenólico y antioxidante. Gracias a todos estos compuestos funcionales, el aceite de coco tiene efectos inmunomoduladores, antihiperlipidémicos, protectores bucales, neuroprotectores, cardioprotectores y antiulcerosos. El coco contiene carbohidratos (10-20 %), grasas (27-35 %) y proteínas (3-4 %), y ha sido conocido por sus propiedades curativas en la medicina Ayurvédica y otras medicinas tradicionales durante más de 4000 años, el núcleo o endospermo es la parte del fruto más relevante. (Beegum et al., 2022)

Contiene principios activos, en las hojas se encuentra acetato de lupeol, en el aceite α - tocoferol y ácido láurico, en la raíz saponina, en la fibra catequina y la inflorescencia de fibra de coco tiene tanino. Por lo tanto, puede usarse en la dieta humana para mejorar la inmunidad, reducir el daño hepático y estabilizar los lípidos del cuerpo, así como también reduce la carga viral del VIH. (Bukhari et al., 2019).

El ácido láurico copia la estructura del peptidoglicano presente en la pared celular de las bacterias. Cuando el VCO entra en contacto con las células bacterianas, el ácido láurico presente en el aceite recubre toda la superficie celular, penetrando lentamente en su interior. Este proceso cambia la fluidez de la membrana celular, lo que conduce a una alteración de la permeabilidad y finalmente, a la ruptura de la pared celular, lo que afecta el metabolismo y provoca la muerte celular. (Beegum et al., 2022)

El mecanismo de acción del aceite de coco actúa cuando el ácido láurico se combina químicamente con el hidróxido de sodio y el bicarbonato presente en saliva que impiden la agregación y adhesión del biofilm dental en la superficie de los dientes, conocido como proceso de saponificación. La alta viscosidad del aceite de coco impide la agregación de placa y la adhesión bacteriana en la superficie del diente. Así mismo, los ácidos monoláurico y monocáprico presentes en el aceite tienden a penetrar las membranas celulares y eventualmente suprimen a los agentes patógenos al inhibir las enzimas utilizadas en la producción de energía y la transferencia de nutrientes. (Seher et al., 2018)

Técnicas de extracción del aceite de coco

La extracción de aceite es un tratamiento ayurvédico tradicional, se utilizó por primera vez en la antigua India y se menciona en los libros de texto escritos por Charaka y Sushruta, brindando

múltiples beneficios en cuanto a enfermedades como la gingivitis, xerostomía, caries dental y halitosis, así como también contribuye en el fortalecimiento de la higiene bucal. (Woolley et al., 2020; Seher et al., 2018)

El endospermo de coco se procesa húmedo (VCO: aceite de coco virgen) o seco (aceite de copra/aceite de coco) para la extracción de aceite. Se seca hasta un contenido de humedad inferior al 6 % para conseguir la copra, que luego se muele, se evapora y se expulsa mediante una prensa de cuña, una prensa de tornillo o una prensa hidráulica para extraer el aceite de coco. (Beegum et al., 2022)

Extracción húmeda

También conocida como método doméstico, consiste en la separación del agua de la leche de coco. El proceso de ruptura de la emulsión implica los pasos de formación de crema, floculación o agrupación y coalescencia (aglomeración de partículas en una suspensión coloidal para formar partículas o gotas más grandes). La etapa de formación de crema inicia por la acción de la fuerza gravitacional que da como resultado dos fases, donde la fase de gravedad específica más alta se mueve hacia abajo y la más baja se mueve hacia arriba. Continúa con la floculación o agrupamiento, donde la fase oleosa se agrega sin romper la película interfacial que rodea cada glóbulo de aceite. El proceso de extracción húmeda de VCO es mejor que el procesamiento seco y los métodos de extracción con solventes orgánicos debido a su capacidad para conservar las composiciones naturales y la fragancia del aceite, además de estar libre de cualquier forma de químicos y/o solventes orgánicos. Por lo tanto, este proceso es más respetuoso con el medio ambiente. Sin embargo, este método de extracción tiene algunos inconvenientes ya que requiere de 24 a 48 h y el rendimiento de aceite es menor, que es aproximadamente del 40%. (Sundrasegaran & Mah, 2020)

Método de procesamiento en seco

Se utiliza comercialmente para producir VCO por fuerza mecánica, ya que una vez extraído tiene un bajo contenido de humedad, lo que evita la contaminación microbiana y permite la ampliación del proceso de extracción para satisfacer la demanda del mercado. La carne de copra rallada fresca se seca al sol o al horno a 40–50 °C hasta que la humedad se reduce de aproximadamente el 50 % al rango de 2–5%. El rendimiento de VCO corresponde al contenido de humedad, donde el coco rallado deshidratado con menor contenido producirá un mayor rendimiento de VCO. Posteriormente al secar el coco rallado, el aceite se recolecta mediante prensado en frío, lo que da un rendimiento de aproximadamente 46 a 49 %. (Sundrasegaran & Mah, 2020)

Proceso de extracción en caliente

Requiere calor para poder romper la emulsión entre las moléculas de agua y aceite, su objetivo es desequilibrar la emulsión desnaturalizando las proteínas. (Ng et al., 2021)

Se obtiene hirviendo la leche de coco para evaporar el agua, dejando atrás el aceite. Para extraer leche de coco, los procesos duran una hora o hasta que se separan todos los aceites de la leche. El rendimiento del método es del 33 %, que es inferior en comparación con otros métodos de extracción, como la extracción en seco, la fermentación y la extracción con fluidos supercríticos (SFE). (Sundrasegaran & Mah, 2020)

Refrigeración, congelación y descongelación

Es utilizado para romper la emulsión de agua y aceite, donde la leche de coco se centrifuga a 3220 g durante 10 minutos y la capa superior de la crema, se debe eliminar el sobrenadante antes de enfriar y congelar. Por lo general, las temperaturas utilizadas para el enfriamiento y la

congelación son de 10 y -4°C , durante 6 horas en total. Posteriormente, se realiza el proceso de descongelación en baño maría a 40°C hasta que la crema centrifugada alcanza la temperatura ambiente de 25°C . A continuación, la nata se centrifuga dos veces a 4000 g durante 30 min para obtener el VCO. Durante el proceso de descongelación, las gotas de aceite se fusionan y forman gotas grandes de varios tamaños, lo que a su vez dio un rendimiento total de extracción de aceite del 69 %. (Ng et al., 2021)

Fermentación

Implica la utilización de cultivos puros de bacterias tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus casei*. Entre las cepas, *L. plantarum* toma mayor relevancia debido a su rápida tasa de crecimiento en la leche de coco en el rango de temperatura de $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$, con una producción considerable de ácido láctico que muestra una rápida ruptura de la emulsión y liberación del aceite. Con base en un estudio previo realizado por Sundrasegaran & Mah, la separación más eficiente de la crema de coco se obtiene mediante la incorporación de 5% *L. plantarum* con un tiempo de sedimentación de 10 horas y la recuperación total de aceite obtenida es de hasta el 95%. Así mismo, la emulsión de leche de coco se puede separar ajustando el pH entre 3,0 y 5,6 con la inoculación de cultivos bacterianos. (Sundrasegaran & Mah, 2020)

Necesita una cantidad mínima de calor, conservando así todos sus nutrientes, como cuando se utiliza el método de extracción en frío. El aceite de coco producido con este método también mantiene su sabor natural a coco siempre que no se fermente durante un periodo prolongado. (Ng et al., 2021)

Centrifugación

Es una técnica que consiste en disociar partículas en función de su respectivo tamaño, forma, densidad, viscosidad del medio y la velocidad del rotor. Se analizan diversos parámetros para la extracción de aceite de coco mediante el método de centrifugación, incluido el tiempo, la velocidad y la temperatura. Al aumentar la velocidad del centrifugado, el rendimiento de aceite de coco también aumenta, alcanzando un 9,27 % cuando se centrifuga durante 15 min a 12.000 rpm. En cuanto al tiempo de centrifugado, cuanto más se centrifuga la muestra, mayor es el rendimiento de aceite de coco. Cuando la temperatura de centrifugado se reduce de 40 a 20°C, el resultado muestra una tendencia a la baja. A 20°C, el rendimiento del aceite de coco fue de 3.1% cuando se centrifuga a 12000 rpm. (Ng et al., 2021)

Proceso de extracción en frío

Consiste en que el aceite de coco se extrae de la leche de coco sin comprometer procesos de calentamiento para romper la emulsión. La cáscara externa de los cocos maduros se elimina para conseguir la pulpa blanca dentro de la fruta. El motivo por el cual se eligen cocos maduros en lugar de cocos jóvenes es porque el contenido de aceite en la fruta se incrementa. (Ng et al., 2021)

Extracción enzimática

El aceite de coco se puede extraer agregando una mezcla de varios tipos de enzimas a la leche de coco. (Ng et al., 2021). Se realiza un estudio previo que incluye el uso de enzimas de celulasa, α -amilasa, poligalacturonasa y proteasa, ya sea individualmente o en una mezcla, para degradar los componentes estructurales de la pared celular, incluidos manano, galactomanano, arabinosilogactano y celulosa. Se utilizan enzimas individuales y combinaciones de enzimas. El coco rallado y el agua se mezclan en una proporción de 1:4 y se incuban durante 30 minutos con

diferentes combinaciones de enzimas. El rendimiento del aceite extraído usando proteasa y poligalacturonasa es 32% y 36%, seguido de celulasa y α -amilasa con el mismo rendimiento al 28%. Evidenciaron que los rendimientos de la extracción de aceite utilizando una combinación de enzimas eran más altos que los de las enzimas individuales. El rendimiento de la combinación de celulasa y α -amilasa es del 36%, celulasa, α -amilasa y poligalacturonasa es del 37% y celulasa, α -amilasa, poligalacturonasa y proteasa es del 42%, mientras que los del aceite extraído con enzimas son superiores a los de la extracción sin enzima, con solo un 19%. La extracción de aceite utilizando una combinación de cuatro enzimas da un mayor rendimiento debido a la alta tasa de hidrólisis de los componentes de la pared celular. (Sundrasegaran & Mah, 2020)

Dióxido de carbono supercrítico

Es una molécula que es sometida a una presión y temperatura superior a su punto crítico. Exhibe propiedades particulares y tiene un comportamiento intermedio entre un líquido y un gas. El dióxido de carbono es el fluido supercrítico más utilizado, ya que tiene un costo bajo y tiene propiedades químicas constantes, es inerte, no inflamable y no tóxico. (Ng et al., 2021).

El dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) se selecciona en la extracción de VCO debido a su temperatura y presión crítica más baja, que pueden evitar la degradación de componentes menores y sensibles al calor. La naturaleza no polarizada de SC-CO₂ es capaz de solvatar las gotas de aceite y posteriormente mejorar el proceso de extracción. Durante la extracción del aceite vegetal, la solubilidad de los triglicéridos en el SC-CO₂ va a depender del número de carbonos de los ácidos grasos en los triglicéridos, cuanto más corta es la cadena, más soluble es en el SC-CO₂. El VCO es rico en MCFA, que se compone de cadenas de ácidos grasos con 16 carbonos o menos, lo que aumenta la solubilidad en SC-CO₂ en comparación con otros aceites vegetales como el

aceite de canola, el aceite de colza y el aceite de maíz. Además, la solubilidad de VCO en el SC-CO₂ aumenta con el aumento de la presión y la temperatura. (Sundrasegaran & Mah, 2020)

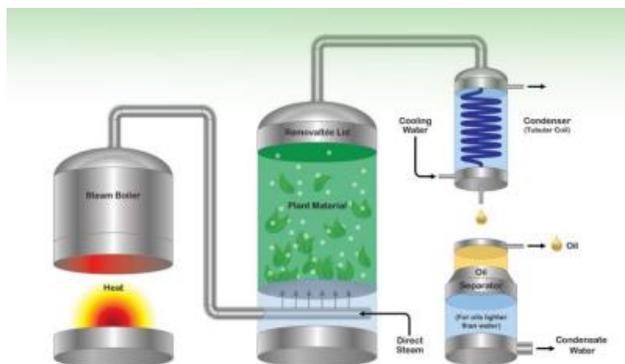
La temperatura y presión óptimas obtenidas son 80°C y 345 bar con un rendimiento de extracción VCO del 99%. El VCO extraído se puede usar directamente sin ningún otro proceso de refinación. Aunque este método puede obtener un mayor rendimiento de VCO en comparación con otros métodos de extracción convencionales, esta tecnología de extracción emergente no es tan popular como otros métodos de extracción mencionados anteriormente debido a la costosa configuración del sistema de extracción. (Sundrasegaran & Mah, 2020)

Extracción por arrastre de vapor

Este sistema no alcanza grandes temperaturas, correspondiendo a la destilación con vapor de baja presión y a la vez se produce muy poca descomposición de la materia prima (*cocos nucifera*) como se observa en la *figura 1*. El proceso de destilación por arrastre por vapor de agua favorece los costos de operación que son relativamente bajos, presenta mayor capacidad de producción y alto rendimiento, siendo así el método más empleado en la industria de los aceites esenciales. (Condori & Palomino, 2022)

Figura 1.

Montaje de destilación por arrastre de vapor.



Nota: La figura muestra el montaje de destilación por arrastre de vapor. Fuente: Science Direct, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652604000654>

Streptococcus mutans

En 1924, J. Clark aisló el principal microorganismo desencadenante de la caries dental y lo llamó *Streptococcus mutans* porque creía que las células ovales observadas eran formas mutantes de *Streptococcus*. Sin embargo, no fue hasta finales de la década de 1950 que *S. mutans* recibió una atención científica generalizada y, a mediados de la década de 1960, los estudios clínicos y de laboratorio con animales identificaron a *S. mutans* como un importante factor etiológico de la caries dental. El hábitat natural de *S. mutans* es la cavidad oral, en especial, el biofilm dental, una biopelícula multiespecie que se forma en la superficie dura de los dientes. El potencial cariogénico de *S. mutans* radica en tres propiedades principales, la capacidad de sintetizar grandes cantidades de polímeros de glucano extracelulares a partir de sacarosa, lo que contribuye a la formación de superficies duras, continuidad y crecimiento de polímeros *in situ*, la capacidad de transportar y convertir una variedad de carbohidratos en ácidos orgánicos (acidez) y la capacidad de crecer bajo estrés ambiental, especialmente a pH bajo. (Lemos et al., 2019)

Streptococcus mutans es catalasa negativo, no móvil y produce ácido láctico rápidamente. Esta bacteria metaboliza una variedad de carbohidratos y genera ácidos como productos de desecho que producen factores de virulencia como acidogenicidad, aciduricidad y acidofilicidad. El pangenoma de *S. mutans* es abierto, vinculado a un genoma central, que consiste en genes involucrados en actividades como metabolizar, almacenar o procesar la transmisión de información genética. (Sáenz Rivera et al., 2021).

Como bacteria ácido láctica, *S. mutans* utiliza únicamente la glucólisis para la producción de energía. Una característica distintiva de este microorganismo es la capacidad de metabolizar una variedad de carbohidratos. El genoma de la cepa UA159 codifica 14 azúcares dependientes de fosfoenolpiruvato: PTS es específico para varios monosacáridos y disacáridos, y dos transportadores de cassette de unión a ATP están principalmente involucrados en la formación de oligosacáridos. (Lemos et al., 2019)

Factores de virulencia del *Streptococcus mutans*

La virulencia de un microorganismo, hace referencia a su capacidad de causar daño, es decir, de producir enfermedad. Entre los factores de virulencia asociados en la formación de caries dental, *S. mutans* posee:

Acidogenicidad: *S. mutans* fermenta una variedad de azúcares y produce ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico, así como también productos metabólicos finales a través de la glucólisis. La acumulación de ácido reduce el pH de la placa dental en la cavidad bucal y provoca la desmineralización del esmalte. (Machado y Reyes, 2021).

Aciduricidad: Capacidad de producir ácido y de sobrevivir en un medio con pH bajo. (Machado y Reyes, 2021).

Acidofilicidad: Habilidad para lograr la fermentación de varios carbohidratos de la dieta, reduce rápidamente el pH de la boca. Por lo tanto, esto hace que el biofilm dental sea desfavorable para otras especies y provoca caries debido a la desmineralización. (Machado y Reyes, 2021).

Este microorganismo utiliza varios factores de virulencia que contribuyen a la formación de biopelículas cariogénicas y al desarrollo de caries. Las glucosiltransferasas (Gtfs) son importantes factores de virulencia de *Streptococcus mutans*. Codificadas por tres genes (gtfB, gtfC y gtfD), estas enzimas usan azúcares para sintetizar glucanos que facilitan la unión de células bacterianas y la formación de biopelículas. (Zhang et al., 2022)

Los genes GTFB y GTFC, que sintetizan principalmente glucanos insolubles en agua ricos en enlaces glucosídicos α -1,3, se encuentran en la superficie celular y están codificados por los genes gtfB y gtfC, respectivamente. Por otro lado, GTFD, que sintetiza glucanos solubles en agua ricos en enlaces glucosídicos α -1,6, se encuentra en el fluido de cultivo y está codificado por el gen gtfD que produce principalmente glucanos solubles (a menudo llamados dextrano). Cada enzima consta de dos dominios funcionales, un dominio catalítico amino-terminal (CAT) que se une e hidroliza sustratos de sacarosa, y un dominio de unión a glucano (GBD) carboxi-terminal que actúa como un aceptor para la unión de glucano. Papel importante en la determinación de las propiedades de las cadenas de azúcar sintetizadas por GTF. Se requiere la síntesis simultánea de glucanos de GTFB y GTFC para generar una matriz que mejore la integridad y adhesión de las células bacterianas a la superficie del diente, lo que permite la formación de biopelículas de alta densidad. (Matsumoto-Nakano, 2018)

S. mutans es considerado el principal creador de sustancias poliméricas extracelulares, siendo una de las bacterias formadoras de biopelícula más conocidas en la cavidad oral. Se reportó

como el microorganismo más asociado en la transición de la flora oral de una sana a una cariogénica. (Sun et al., 2021)

Síntesis de glucano: Esta bacteria Gram-positiva sintetiza glucano para la adhesión e interactúa con otras especies bacterianas, dando como resultado la formación de biopelículas dentales complejas que contribuyen a la caries dental. Las biopelículas son comunidades de células bacterianas adheridas firmemente a las superficies y encapsuladas en una matriz extracelular auto secretada que puede proteger eficazmente a las células bacterianas de los entornos difíciles. En comparación con las células planctónicas, las bacterias del biofilm son muy resistentes a los agentes antimicrobianos y albergan mecanismos de defensa inmunitaria, lo que dificulta la prevención y el tratamiento de las infecciones asociadas al biofilm. (Zhang et al., 2022)

Proteínas de unión a glucanos: *S. mutans* también produce varias proteínas de unión a glucanos (proteínas Gbp) que promueven la adhesión. También el antígeno c de proteína de superficie celular (PAC), está asociado con el desarrollo de caries, lo que reduce su virulencia y susceptibilidad al desarrollo de la misma en la superficie del diente, al interactuar con la capa salival. Juntas, las proteínas de la superficie de estas bacterias forman la placa que causa la caries. La formación de biopelículas se da por la interacción de las bacterias planctónicas con la superficie oral en respuesta a señales ambientales apropiadas. *S. mutans* es capaz de transformar los carbohidratos para adherirse a las superficies de los dientes y formar biopelículas, lo que permite que los patógenos toleren fluctuaciones ambientales rápidas y frecuentes, como la disponibilidad de nutrientes, que varía de aeróbico a anaeróbico y cambia el pH. (Matsumoto-Nakano, 2018)

El antígeno de proteína de superficie c (PAC): Es una de las principales proteínas de superficie de *S. mutans* y se conoce por muchos otros nombres, incluidos SpaP, antígeno I/II y antígeno B, P1 y MSL-1. El PAC se correlaciona con la virulencia del organismo involucrado en

el desarrollo de caries y en la adhesión de bacterias a los dientes al interactuar con la membrana salival, denominada adhesión, independiente de la sacarosa. El gen PAc *Streptococcus mutans* serotipo C *mutans* fue clonado, secuenciado, evidenciando que contenía la secuencia señal N-terminal, una región con una secuencia de tres repeticiones de 82 terminales rica en alanina (la región A) en un tercio del extremo N-terminal de la molécula, así como un área con una cadena de tres repeticiones ricas en prolina de los 39 radicales (región P) en el centro de la molécula. Además, se describen secuencias específicas del dominio C-terminal que penetra en las paredes y membranas de las proteínas de superficie de los *Estreptococos*. Además, la región A está estrechamente relacionada con la adhesión a la superficie del diente, mientras que la región P tiene una alta afinidad por las PAc. En algunos estudios reportaron la asociación de PAc con la virulencia de *S. mutans* para desarrollar endocarditis infecciosa (EI). (Matsumoto-Nakano, 2018)

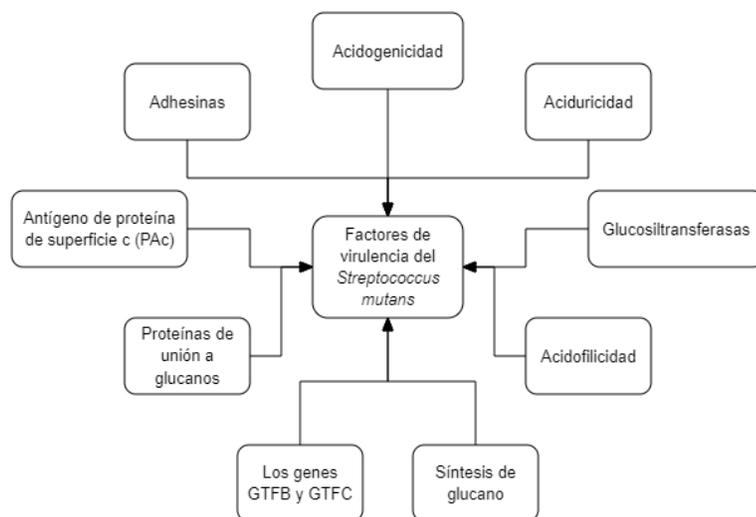
Los carbohidratos fermentables consumidos por el huésped son sustratos para *S. mutans* y otras bacterias ácido lácticas, lo que en última instancia conduce a la formación de productos finales ácidos que se acumulan dentro de la biopelícula. Para crecer a un pH bajo, *S. mutans* induce la llamada respuesta de tolerancia a los ácidos, un poderoso mecanismo de adaptaciones fisiológicas y transcripcionales involucradas en la inducción de vías citoplasmáticas y cambios en la composición de la membrana de ácidos grasos, protegiendo a la célula de mecanismos nocivos de los ácidos y promueve la supervivencia bacteriana en tiempos de estrés.

S. mutans también tiene muchas adhesinas de alta afinidad que permiten la colonización incluso en ausencia de sacarosa. Una de las adhesinas más estudiadas es el antígeno dual I/II, también conocido como P1, SpaP o PAc. Esta adhesina multifuncional estructuralmente compleja participa en la unión bacteriana a la membrana salival del diente al interactuar con la glicoproteína del receptor de eliminación del huésped GP340 o DMBT-1. (Lemos et al., 2019)

Streptococcus mutans presenta diversos factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de la caries. En la *figura 2*. se resumen algunos de ellos.

Figura 2.

Factores de virulencia de Streptococcus mutans



Nota. La figura muestra los factores de virulencia de *Streptococcus mutans*. Fuente: Autoría propia.

Caries dental

La microbiota asociada con un estado saludable se considera en equilibrio, mientras que la microbiota asociada a la enfermedad está influenciada por microorganismos patológicos, que tienen funciones metabólicas y un potencial de virulencia alto que están ausentes en la salud. Una vez que una comunidad ha hecho la transición a un estado disbiótico, la estabilidad estructural de los componentes patógenos permitirá que la condición persista durante un periodo duradero y la enfermedad oral como la caries dental a menudo puede volverse crónica y progresar lentamente. El alto consumo de carbohidratos fermentables promueve la transición a una comunidad de biopelícula patógena. Si la ingesta de azúcar es baja y poco usual, las comunidades microbianas

en los dientes se mantienen estables y, a pesar de producir ácidos que desmineralizan el esmalte, la reducción del pH puede ser sencillamente neutralizada por la saliva, que restablece y mantiene la mineralización del esmalte. (Lamont et al., 2018)

Con una dieta sana y equilibrada con bajos niveles de azúcar, los mecanismos fisiológicos de la cavidad oral como la saliva, evita que se produzcan cambios en el tejido dental a través de los cristales de hidroxiapatita antes de la ruptura del esmalte, al restaurar el pH y remineralizar. El consumo excesivo de alimentos ricos en azúcar provoca un desequilibrio en el microbioma oral (disbiosis), lo que fomenta la competitividad bacteriana de la biopelícula dental. Los fructanos y los glucanos son polímeros derivados de la sacarosa que promueven la cohesión y la adhesión del microorganismo. Entre las funciones protectoras de la saliva se encuentran la dilución y limpieza de la cavidad oral, lo que amortigua y permite el intercambio iónico. El funcionamiento de esta depende de la consistencia y velocidad del flujo. (Lima et al., 2022)

Distintos procesos subyacen al cambio de una comunidad microbiana a un estado de disbiosis. Las variaciones en la competencia inmune o la dieta del huésped pueden alterar la composición de la comunidad y el panorama meta transcripcional, con aumentos en la producción de factores de virulencia. En la medida en que se establece una comunidad, el metabolismo microbiano y los subproductos de la respuesta inmunitaria del huésped pueden inducir a cambios en el entorno local que favorecen el crecimiento o la representación excesiva de microorganismos asociados con un estado disbiótico. (Lamont et al., 2018)

Los microorganismos orales causan enfermedades principalmente de manera sinérgica o cooperativa e interactúan entre especies en el microbioma debido a las características del ecosistema oral primario, especialmente la variabilidad, heterogeneidad y abundancia de la misma. En la cavidad oral, habitan cantidad de microorganismos, los pertenecientes al género

Streptococcus, principalmente especies *mutans*, son los que están más implicados en el proceso carioso. (Machado y Reyes, 2021).

La caries dental es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, inicia en la superficie de los dientes, se origina a partir de la desmineralización del esmalte por ácidos orgánicos producidos por determinados microorganismos en cavidad oral que participan en la transformación de los carbohidratos. (Marqués et al., 2021).

Es causada por niveles prolongados de pH bajo en la boca y se desarrolla con el tiempo en una interacción compleja entre bacterias, se han encontrado más de 700 bacterias diferentes en la cavidad bucal humana, teniendo mayor relevancia *Streptococcus mutans*. Una característica clave importante que contribuye a la patogenicidad de este microorganismo es su capacidad para transportar y convertir diversos nutrientes de la dieta y la saliva del huésped en ácidos orgánicos. *S. mutans* puede sobrevivir en ambientes de pH bajo y metabolizar una variedad de azúcares, incluidas la glucosa, la fructosa y la sacarosa. (Aqawi et al., 2021)

El dolor, infección, deterioro funcional y reducción de la calidad de vida, así como altos costos en el tratamiento son consecuencias de la caries dental. Esta patología es una enfermedad dependiente del ácido que producen las bacterias involucradas en el proceso cariogénico, lo que provoca la desmineralización del esmalte. La sacarosa es el carbohidrato más cariogénico porque promueve el crecimiento de *Streptococcus* principalmente de las especies *mutans* y otras especies acidogénicas, y sirve como sustrato para la síntesis de polisacáridos extracelulares e intracelulares. (Romero Gonzáles, 2019)

La estructura del biofilm está compuesta por moléculas orgánicas y microorganismos, la mayoría de las bacterias cariogénicas poseen la capacidad de adherirse a las superficies y formar

una biopelícula. Las principales bacterias que se adhieren inicialmente son el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* usando las proteínas de adhesión PAc y glucosiltransferasa. (Morón Araujo, 2021)

El éxito de un microorganismo para producir biofilm radica en la colonización de nuevos hábitats, por lo que se propaga por la boca. Entre las principales características de las biopelículas bacterianas se encuentran: adherencia a las superficies, infección localizada, tolerancia al tratamiento antibacteriano, lo que genera una respuesta inmune. Inicialmente la biopelícula se va a situar en zonas rugosas, zonas interdentes y oclusales del diente, luego a los cambios y condiciones del nicho como lo son el pH, iones y temperatura. Con el tiempo se extiende hacia el surco y allí, dadas las modificaciones en las condiciones del nicho, en cuanto a la disposición de oxígeno y características de los tejidos blandos se coloniza con microorganismos anaerobios, especialmente *prevotellas* y *porphyromonas* que cambian la patogenicidad del biofilm oral y que van a iniciar las variaciones clínicas propias de las periodontopatías. (Morón Araujo, 2021)

No solo el *Streptococcus mutans* es el microorganismo implicado en el proceso carioso, existen otros patógenos que también contribuyen al desarrollo de esta, como se describen a continuación:

Lactobacillus acidophilus

Son bacterias anaerobias Gram positivas, catalasa negativa, acidogénicas y formadoras de ácido, con capacidad de realizar un metabolismo tanto oxidativo como fermentativo. Desempeña un papel importante en el desarrollo de lesiones cariosas, este microorganismo es capaz de metabolizar rápidamente la glucosa de los alimentos en ácidos orgánicos, aumentando así la acidez dentro de la cavidad oral y acelerando el proceso de caries. (Kania Tri Putri et al., 2020)

Actinomyces

Las especies de *Actinomyces* (que se originan de las palabras griegas *aktinos* (rayo) y *mykes* (hongo), correspondientes a la disposición radial de los filamentos bacterianos son miembros de bacilos Gram positivos anaerobios que no forman esporas. Taxonómicamente, el género *Actinomyces* es parte del orden *Actinomycetales* del filo Actinobacteria (caracterizado por un alto contenido de guanina-citosina (G+C) en su genoma, 55–68% en el caso del género *Actinomyces*). Poseen una morfología pleomórfica que va desde varillas ramificadas hasta cocobacilos, varios niveles de aerotolerancia y tinción no ácido-resistente. (Gajdács et al., 2019)

Estos microorganismos se encuentran predominantemente en la cavidad oral y están abundantemente presentes en el surco gingival, las bolsas periodontales, las criptas amigdalinas, así como en los dientes cariados y en el biofilm dental. (Gajdács et al., 2019)

Capacidad inhibitoria del aceite de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*

El aceite esencial de *Cocos nucifera* ha demostrado tener múltiples beneficios en la salud, destacándose por sus importantes propiedades bactericidas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, entre otras. Diversos estudios han evidenciado la eficiencia que puede tener este aceite esencial en cavidad oral, inhibiendo al *Streptococcus mutans*, que es el principal patógeno que da inicio al proceso carioso. (Bukhari et al., 2019)

Según Vásquez & Guardia (2021), a través de un estudio transversal y experimental determinaron el efecto antibacteriano del aceite de Coco (*Cocos nucifera*) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, el efecto se determinó mediante el halo de inhibición y la concentración mínima inhibitoria, utilizando penicilina G procaínica como control positivo y suspensión estándar de *Streptococcus mutans* como control negativo. Se realizaron doce réplicas por concentración de

aceite de coco (25%, 50% y 75%). La concentración de aceite de coco al 25% generó una media inhibitoria de 17 mm y $2,23 \times 10^2$ UFC, al 50 % una media de 21,75 mm y $0,17 \times 10^2$ UFC, al 75 % una media de 22 mm y 0 UFC, la penicilina G procaína una media de 14,25 mm y 0 UFC, el control negativo dio una media de $2,8 \times 10^5$ UFC. Obtenidos estos resultados se concluye que todas las concentraciones de aceite de coco mostraron acción inhibitoria sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La concentración del 75 % mostró la media inhibitoria más alta y fue la concentración inhibitoria mínima que eliminó completamente las UFC.

Kaushik et al., (2016) realizaron un estudio controlado aleatorizado y seleccionaron 60 sujetos. Los sujetos los dividieron en tres grupos, Grupo A: Grupo de estudio: Extracción de aceite, Grupo B: Grupo de estudio: Clorhexidina y Grupo C: Grupo de control: Agua destilada. Los sujetos del grupo A se enjuagaron la boca con 10 ml de aceite de coco durante 1 minutos. Los sujetos del grupo B se enjuagaron la boca con 5 ml de enjuague bucal de clorhexidina durante 1 minuto y los del grupo C con 5 ml de agua destilada durante 1 minuto por la mañana antes del cepillado. Recogieron y cultivaron muestras de saliva el primer día y después de 2 semanas de todos los sujetos. Contaron las colonias para comparar la eficacia del aceite de coco y la clorhexidina con agua destilada. Los resultados evidenciaron una reducción estadística significativa sobre *S. mutans*, tanto en el grupo que utilizó aceite de coco como el de clorhexidina.

Sari et al., (2019) comprobaron mediante un estudio que consistió en una muestra de microorganismos de cepas clínicas y de laboratorio la efectividad antibacteriana del VCO frente a *S. mutans*, fue evaluado mediante una prueba de cristal violeta y recuento de colonias (unidades formadoras de colonias[UFC]/mL). Los sujetos fueron seleccionados por examen de higiene bucal y caries infantil. Los criterios de inclusión fueron niños de 0 a 72 meses de edad, dentición temporal, puntuación del índice de dientes cariados, extraídos, obturados y sin enfermedad

sistémica. La espuma de VCO redujo significativamente el número de *S. mutans*, VCO demostró funcionar como un agente antibacteriano y antifúngico. El efecto antibacteriano proviene del contenido de ácido láurico en el aceite de coco, que también tiene actividad antimicrobiana, especialmente contra *Streptococcus*.

Baqer Lamyaa (2020) señala que las especies bacterianas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* fueron obtenidas de pacientes con caries dental que consultaron en la clínica dental de la Facultad de Odontología de Basora. Las cepas bacterianas fueron aisladas en el laboratorio del departamento de microbiología del mismo colegio mediante el cultivo del material de hisopado en los medios selectivos apropiados y su identificación mediante las pruebas bioquímicas pertinentes. El *Streptococcus mutans* fue expuesto a concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%, fueron analizadas por separado mediante un estudio *in vitro* de las bacterias aisladas. Como resultado se obtuvieron los siguientes valores: 25% - 4mm, 50% - 10mm, 75% - 14mm, 100% - 18mm, correspondiendo el porcentaje a la concentración de aceite de coco y el siguiente valor al microorganismo *Streptococcus mutans*.

Ahmed et al., (2020) realizaron un estudio cuya población fue de 60 niños egipcios, con edades que oscilaban entre (5 y 10) años. Los niños (60) fueron divididos en dos grupos; cada grupo consta de 30 niños (Grupo A, Grupo B). Grupo A (grupo de estudio): Cada participante recibió instrucciones de enjuagarse con 10 ml de aceite de coco 3 veces al día durante dos semanas con un promedio (1 minuto / enjuague), Grupo B (Grupo de control): El enjuague bucal con clorhexidina (0,2%) consistió en treinta niños, cada participante recibió instrucciones de enjuagarse con 10 ml de enjuague bucal con clorhexidina, 3 veces al día durante dos semanas con un promedio (1 minuto/enjuague). Observaron una reducción estadísticamente significativa en el recuento de *Streptococcus mutans* en los grupos de extracción de aceite y clorhexidina, pero se

encontró que la reducción fue mayor en el grupo que utilizó enjuague de aceite de coco que en el grupo de clorhexidina.

Peedikayil et al., (2016) utilizaron dos aceites herbales (*Cocos nucifera* y *Nigella sativa*) y gluconato de clorhexidina al 0,2% como control positivo. *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, y *Candida albicans* fueron aislados e incubados. El efecto inhibitor del crecimiento de los materiales probados fueron evaluados mediante el método de contacto directo para cada microorganismo por separado mediante la adición de 0,5 ml del material ensayado a cada organismo en un tubo estéril e incubado a 37°C en aerobiosis para *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* y en anaerobiosis para *Lactobacillus*, luego los microorganismos ensayados los esparcieron en medios específicos. El recuento de microorganismos se expresó como UFC/placa y se registró a las 2 y 24 horas. El aceite de coco mostró un marcado porcentaje de reducción tanto en *Sreptococcus mutans* como en *Candida albicans* (89,3% y 87,3%) después de un periodo de contacto de 24 horas. El aceite de *Nigella Sativa* mostró una marcada reducción en *S. mutans* después de solo 2 horas (68,33%) sin efecto en *Candida albicans*. Ambos aceites no tuvieron efecto sobre *Lactobacillus*. El mayor porcentaje de reducción de todos los microorganismos probados se registró con clorhexidina.

Pruebas de sensibilidad microbiana

Las pruebas de sensibilidad microbiana determinan la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos, a partir de la exposición a una concentración estandarizada del germen a estos fármacos. Para descifrar la lectura de las pruebas de sensibilidad, es necesario conocer el espectro del agente antimicrobiano, algunas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como los principales mecanismos de resistencia a ellos. Drummond et al., (2022). Algunas de ellas son:

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI, o concentración inhibitoria mínima, es la concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa de bacterias. Las pruebas de susceptibilidad cuantitativa proporcionan valores de MIC que ayudan a determinar qué antibiótico es más efectivo. Esta información puede conducir a la correcta selección de antibióticos que aumentarán la posibilidad de un tratamiento exitoso y ayudan a combatir la resistencia a los antibióticos. Este método se usa para determinar la menor concentración de cada uno de los extractos que inhibe el crecimiento bacteriano. (Sánchez et al., 2020)

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Es la que mide la concentración mínima de antimicrobiano que elimina a más del 99,9 % de los microorganismos viables después de 24 horas de incubación. (Sánchez et al., 2020)

Dosis letal 50

Fue creada por Trevan, J.W. en 1927. Es la dosis de una sustancia o radiación que puede ser letal para la mitad de un grupo. Existe la posibilidad de fracaso en los experimentos si la dosis es incorrecta, una menor DL50 indica mayor toxicidad. (Garófalo et al., 2020)

Es de gran importancia contribuir en la observación, análisis e investigación de la salud, enfocados en la prevención de la enfermedad, esto con el fin de adquirir nuevos conocimientos, poder brindar soluciones de manera eficiente, no solo a partir de procesos invasivos y productos farmacológicos, sino también a partir de productos medicinales de fácil acceso que han demostrado tener excelentes propiedades y cumplir con altos estándares de calidad. En el mercado se encuentran productos farmacológicos que en diversos casos producen efectos secundarios y con el paso del tiempo pueden afectar la salud del paciente, así como también generar resistencia

bacteriana. Es fundamental concientizar a la sociedad de otras alternativas de tratamiento como lo es la medicina alternativa, que resulta ser efectiva, de bajo costo y sobre todo que no presenta efectos colaterales.

Diseño Metodológico

Tipo de investigación

Se realizó un estudio de tipo experimental *in vitro*, en el que se evaluó el efecto de una o más variables, donde se manipuló el objeto de estudio bajo influencia de variables controladas y conocidas.

La investigación experimental se basa en exponer a un objeto o grupo de individuos a ciertas condiciones, estímulos o tratamientos (variable independiente) para observar los efectos que se producen (variable dependiente). Esto se considerará exitoso solo cuando el investigador afirma que el cambio de la variable dependiente es el resultado de la manipulación de la variable independiente. (Alban et al., 2020)

Población y muestra

La población y muestra estuvo constituida por la cepa certificada ATCC® 25175TM de *Streptococcus mutans* y el aceite esencial de *Cocos nucifera*.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión: Cepa certificada de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175TM y aceite esencial de *Cocos nucifera* obtenido mediante destilación por arrastre de vapor en el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño sede Cúcuta.

Criterios de exclusión: Otros microorganismos causantes de caries dental diferentes a *S. mutans* como *Lactobacillus acidophilus* o *Actinomyces*.

Aceites esenciales obtenidos de plantas de canela (*Cinnamomun zeylanicum*), menta (*Mentha piperita*) o caléndula (*Calendula officinalis*).

Variables

Variables dependientes. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera*.

Variables independientes. Aceite esencial de *Cocos nucifera*.

Hipótesis

Hipótesis nula. El aceite esencial obtenido de *Cocos nucifera* no presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*.

Hipótesis alterna. El aceite esencial de *Cocos nucifera* presenta efecto antibacteriano *in vitro*, frente a *Streptococcus mutans*.

Materiales y métodos

El desarrollo de la investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Antonio Nariño Sede Cúcuta. Esta se inició con la recolección de la materia prima (*Cocos nucifera*) y la adquisición de los elementos necesarios para su ejecución (soportes universales, matraces con desprendimiento lateral, serpentín, condensador de reflujo refrigerado por agua, cartucho Soxhlet, columna de extracción donde se inserta el cartucho Soxhlet con el sólido a extraer y que presenta un sifón por donde cae el disolvente después de la extracción hasta el matraz). Se utilizó como microorganismo patógeno cepa de *S. mutans* certificadas ATCC® 25175TM que se evaluó como el agente causal, y aceite esencial de *Cocos nucifera* como el agente antibacteriano que se extrajo mediante destilación por arrastre de vapor.

El equipo de destilación constó de un sistema doble de matraces con desprendimiento lateral, uno de los cuales contuvo agua destilada (1000 ml), que se calentó directamente mediante

un mechero colocado sobre una parrilla con el fin de llevar el agua destilada a su punto de ebullición. (Cedeño et al., 2019)

Al segundo matraz (capacidad de 500 ml) se le añadieron 250 g de materia prima (copra de *Cocos nucifera*), los cocos se adquirieron en plantaciones ubicadas en el municipio del Zulia, Norte de Santander, se procedió a desprender manualmente la copra, la cual fue dividida en trozos pequeños para su extracción. (Cedeño et al., 2019)

Los dos matraces estuvieron unidos por medio de una manguera y pipeta. Se usó vapor saturado a una presión superior a la atmosférica suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho, conforme el vapor entró en contacto con el lecho, la materia prima se calentó y fue liberando el aceite esencial contenido, el cual, a su vez, debido a su alta volatilidad, se fue evaporando. Al ser soluble en el vapor generado del primer matraz, este fue “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del segundo balón. La mezcla de vapor saturado y aceite esencial fluyó desde la salida lateral del segundo matraz a través de otra manguera y pipeta hacia un refrigerante de vidrio o condensador. En el condensador, la mezcla se condensó y se enfrió a temperatura ambiente. El producto destilado obtenido se conservó en un depósito estéril, manteniendo un estado bifásico entre agua y aceite esencial, debido a la diferencia de densidades, el aceite esencial se separó utilizando las pipetas Pasteur, luego se almacenó en un tubo de vidrio con tapón tipo rosca cerrado herméticamente para obtener aproximadamente 50 ml del aceite esencial. El aceite esencial se almacenó a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta su uso. (Cedeño et al., 2019)

El potencial antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera* fue evaluado cuantitativamente utilizando el método de Kirby Bauer (difusión en disco), para lo cual se fabricaron sensidiscos en cartón paja de 6 mm de diámetro, que fueron esterilizados en autoclave. (Fernández y de Rebisso, 2019)

Posteriormente se colocó un sensidisco en el centro de cada una de las 66 caja de Petri utilizando una pinza estéril, marcadas simultáneamente con el aceite y la dilución correspondiente, se procedió a cargar los sensidiscos utilizando una micropipeta con 25µl de cada una de las diluciones del aceite esencial, (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% y 5%), se midió mediante halos de inhibición (mm) con la ayuda de un calibrador de sensibilidad microbiológica para determinar la concentración mínima inhibitoria. Se preparó un control de crecimiento negativo (agua destilada) y un control positivo (Penicilina). (Fernández y de Rebisso, 2019)

Con el aceite esencial de *Cocos nucifera* se realizaron diluciones empleando como diluyente aceite de oliva virgen, se trabajaron concentraciones descendentes desde el 100%, hasta una dilución del 5%, con seis repeticiones, con lo cual se determinó cuál punto de concentración logró inhibir el crecimiento de *S. mutans*.

Para la preparación de los medios de cultivo, se utilizó agar sangre, de acuerdo a las indicaciones del laboratorio fabricante, se suspendieron 40 gramos en un litro de agua destilada, se hirvió durante un minuto hasta que se disolvió completamente. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a 45–50 °C y se añadió asépticamente 5–10% de sangre desfibrinada esterilizada, se homogenizó y se vertió en placas de Petri. Se tuvo cuidado para evitar la formación de burbujas cuando se añadió la sangre de cordero al medio, se giró el frasco o botella suavemente para crear una solución homogénea. (Anexo A)

Para el caldo tioglicolato se procedió a suspender 29,75 gramos en 100 ml de agua purificada/destilada. Se calentó hasta producir la ebullición para disolver completamente en el medio. Posteriormente se dispensó en tubos o matraces, luego se esterilizó en autoclave a una

presión de 15 libras (121°C) durante 15 minutos. Se dejó enfriar a 25°C y se guardó en un lugar fresco y oscuro, a una temperatura por debajo de 25°C. (Anexo B)

La cepa liofilizada ATCC® 25175TM de *S. mutans* (Microbiologics®), se mantuvo almacenada a una temperatura de 2 a 8 °C, para activarla, se debió atemperar al medio ambiente. La activación de la cepa de *S. mutans*, se realizó por medio de un proceso de hidratación. Se presionó (solo una vez) la ampolla en la parte superior del empaque justo debajo del menisco para liberar el hidratante y se forzó el precipitado en el líquido hasta que la suspensión quedara homogénea. Acto seguido, se saturó el hisopo adjunto con los materiales hidratados y se transfirió a un caldo tioglicolato. (Cayo et al., 2021), siguiendo las instrucciones de la casa fabricante se colocó durante 48 h a 37 °C en la incubadora, para luego ser sembrada en cajas de Petri con agar sangre de cordero. Se realizó el control de calidad del patrón de turbidez de 0.5 de McFarland lo que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para ello se agitó vigorosamente el patrón y se comprobó la densidad de este. (Chambilla y Sánchez, 2021) (Anexo C).

Para la determinación de la densidad se utilizó un picnómetro de 5 ml el cual se pesó vacío en una balanza electrónica y luego con el aceite esencial de *Cocos nucifera*. Al peso del picnómetro con aceite se le restó el peso del picnómetro vacío para obtener así la masa. (Chávez et al., 2022)

Posterior a esto se halló la densidad del aceite esencial de *Cocos nucifera* aplicando la fórmula $D = m/v$. (Chávez et al., 2022)

Donde:

D = densidad (g/ml)

m = masa (g)

v = volumen (ml)

$$D = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} = g/ml$$

Una vez obtenida la muestra se procedió a realizar una siembra en estrías con la ayuda de asas estériles, empezando por el límite superior de la caja Petri y diseminando por todo el agar en “zig-zag”. (Pinos et al., 2020)

Para el cultivo microbiano se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, pipetas, tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Las cepas de *S. mutans* se hidrataron en caldo tioglicolato, se sembraron en cajas de Petri y en agar sangre de cordero se incubaron a 37°C durante 24 horas. Luego de 24 horas de incubación se realizó la prueba de tinción de Gram y pruebas de catalasa negativa para *S. mutans*. (Fernández y de Rebisso, 2019)

La prueba de tinción de Gram se compone de cuatro pasos, se inició cubriendo el extendido a colorear con el cristal violeta como colorante primario, para que el colorante en solución acuosa se disoció en iones CV⁺ y CV⁻, los cuales penetraron en la pared celular de las bacterias debido a su alta afinidad por el peptidoglicano. Luego, se retiró el cristal violeta con un chorro suave de agua y se escurrió, se añadió una solución de lugol, solución de yodo en yoduro de potasio, que actuó como fijador del cristal violeta. Este interactuó con los iones CV⁺ formando un complejo cristal violeta-yoduro que saturó los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. Después, se agregó una mezcla de alcohol-acetona que destruyó la capa lipídica de las bacterias Gram negativas las cuales al perder su membrana externa y tener mucho menor cantidad de peptidoglicano, no pudieron retener el complejo cristal violeta-yoduro y lo pierden. Por el contrario, el alcohol acetona deshidrató la pared celular de las bacterias Gram positivas las cuales sufrieron una deshidratación, lo que cerró sus poros permitiendo la retención del complejo cristal

violeta yoduro. Finalmente, se colocó safranina o fucsina como colorante de contratinción para teñir las bacterias Gram negativas que no retuvieron el complejo cristal violeta-yoduro luego de la decoloración. (Casasola Bado, 2022)

La prueba de catalasa se realizó en una lámina portaobjetos y en este caso se colocaron una o dos gotas de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) al 3% en la lámina, se emulsionó una colonia del microorganismo con un asa estéril no metálica y se mezcló suavemente; para ello se contó con la siembra del microorganismo en un agar nutritivo, en este caso, agar sangre de cordero, una vez obtenidas las colonias se le agregaron dos o tres gotas de H₂O₂ al 3% y en ambos casos se observó en un lapso de un minuto la producción de burbujas para determinar si la prueba es positiva, o por el contrario, negativa. (Corrales et al., 2022)

Para determinar la concentración mínima bactericida y dosis L50 se utilizaron cajas de Petri con agar sangre, se procedió a preparar en un tubo de ensayo con caldo tioglicolato una concentración equivalente al patrón de turbidez 0.5 de la escala de McFarland, la cual equivale aproximadamente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, para esto, se tomó una muestra de *S. mutans* y se inoculó en un tubo con solución salina, homogenizando y con ayuda de un turbidímetro leer la turbidez hasta obtener la lectura equivalente a 0,5 del estándar de turbidez de McFarland. En once tubos de ensayo se prepararon diluciones del aceite esencial de *Cocos nucifera* en concentraciones de 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% y 5%. a cada tubo de ensayo, que contuvo 2 ml de cada concentración, se le agregó 25 µl del concentrado de *S. mutans*, y se sometió a un periodo de incubación de 18 a 24 horas a 37°C, una vez finalizada la incubación, se tomó de cada tubo de ensayo 500 µl y con un asa de Drigalsky estéril se extendió en cada caja de agar sangre en toda la superficie de agar, se incubaron las cajas de Petri de 18 a 24 horas a una temperatura de 37°C. Se realizaron 6 repeticiones por cada concentración. Luego del

periodo de incubación se sacaron las cajas de Petri y se realizó un conteo de la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). (Recalde et al., 2018)

Análisis estadístico

En el presente estudio se utilizó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer para evaluar la capacidad del aceite esencial de *Cocos nucifera* para inhibir el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans*, así como también se halló la Concentración mínima bactericida y la Dosis letal 50, teniendo en cuenta el patrón de turbidez 0.5 de la escala de McFarland. Una vez obtenidos los resultados de la medición de halos y Unidades formadoras de colonias (UFC), estos fueron organizados mediante tablas de frecuencia y procesados por medio del programa de Excel 2016.

Resultados

Para determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*, se utilizó aceite esencial extraído mediante destilación por arrastre de vapor de agua en concentraciones descendentes desde el 100% hasta 5% y la cepa certificada de *S. mutans* ATCC® 25175TM.

Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Cocos nucifera* frente a *Streptococcus mutans*

Basado en el halo de inhibición (mm) y las Normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) de los Estados Unidos, se determinó que *S. mutans* es sensible (S) a partir de un halo ≥ 18 mm y resistentes (R) desde un halo < 17 mm. La concentración relacionada con la formación de un halo ≥ 18 mm determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Del aceite esencial de *Cocos nucifera* se prepararon diluciones de 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% y se realizaron 6 repeticiones por cada una, se determinó por medio de halos de inhibición y sensidiscos impregnados en cada una de las concentraciones, CMI frente al *S. mutans* En la *figura 3*. se presentan los resultados obtenidos, en la cual se observa que concentraciones iguales o mayores de 50% son sensibles a *S. mutans* y menores a esta concentración son resistentes, y existe una relación directa entre la concentración y el halo de inhibición.

Tabla 1.

Halos de inhibición de la concentración mínima inhibitoria.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DILUCIÓN	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6		
Control negativo	0	0	0	0	0	0	Prom.	
5%	0	0	0	0	0	0	0	
10%	0	0	0	0	0	0	0	
20%	0	0	0	0	0	0	0	
30%	18	16	14	16	14	13	15,2	15
40%	14	14	18	18	15	16	15,8	16
50%	18	18	18	17	20	19	18,3	18
60%	21	19	21	21	20	19	20,2	20
70%	21	20	21	21	19	22	20,7	21
80%	21	22	23	21	22	21	21,7	22
90%	24	21	23	23	22	22	22,5	23
100%	25	25	24	24	25	25	24,7	25
Control positivo	48mm	48 mm	48 mm	48mm	48 mm	48 mm		

Figura 3.

Presencia de halo de inhibición de S. mutans en solución concentrada de aceite esencial de Cocos nucifera.



Nota. La figura muestra el halo de inhibición a una dilución del 50%, siendo esta la CMI. Fuente:

Autoría propia.

Concentración mínima bactericida y dosis letal 50

Para determinar la CMB y DL50, se realizaron diluciones del aceite esencial de *Cocos nucifera* en concentraciones de 100% hasta 5% teniendo en cuenta el patrón de turbidez 0,5 de la escala de McFarland, la cual equivale aproximadamente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se sembró en agar sangre y se sometieron a incubación de 18-24 horas a 37°C, para posteriormente observar el crecimiento bacteriano representado en UFC.

Se observó que la concentración mínima bactericida (con una inhibición de 99.9%) fue de 145.6 mg/dl y la dosis letal 50 de 91,0 mg/dl.

Tabla 2.

UFC de S. mutans en soluciones de Cocos nucifera (CMB).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA								
Dilución %	Concentración mg/dl	R-1 UFC/ml	R-2 UFC/ml	R-3 UFC/ml	R-4 UFC/ml	R-5 UFC/ml	R-6 UFC/ml	PROMEDIO
Control negativo	n	n	n	n	n	n	n	n
5%	45,5	148000000	149000000	144000000	141000000	145000000	149000000	146000000
10%	91,0	111000000	119000000	122000000	113000000	134000000	122000000	120166667
20%	36,4	95000000	102000000	97000000	98000000	102000000	90000000	97333333
30%	54,6	83000000	87000000	90000000	86000000	89000000	86000000	86833333
40%	56,8	80990000	83720000	77350000	78260000	76440000	82810000	79928333
50%	91,0	77000000	77000000	83000000	77000000	80000000	76000000	78333333
60%	109,2	59000000	65000000	55000000	59000000	62000000	58000000	59666667
70%	127,4	28000000	31000000	27000000	28000000	29000000	30000000	28833333
80%	145,6	157000	159000	161000	159000	160000	175000	161833
90%	163,8	0	0	0	0	0	0	0
100%	182,0	0	0	0	0	0	0	0
Control positivo PENICILINA	20 UI	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3.

UFC de S. mutans en soluciones de Cocos nucifera (DL50).

DOSIS LETAL 50								
		R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	
Dilución %	Concentración mg/dl	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	PROMEDIO
Control negativo	n	n	n	n	n	n	n	n
5%	45,5	148000000	149000000	144000000	141000000	145000000	149000000	146000000
10%	91,0	111000000	119000000	122000000	113000000	134000000	122000000	120166667
20%	36,4	95000000	102000000	97000000	98000000	102000000	90000000	97333333
30%	54,6	83000000	87000000	90000000	86000000	89000000	86000000	86833333
40%	56,8	80990000	83720000	77350000	78260000	76440000	82810000	79928333
50%	91,0	77000000	77000000	83000000	77000000	80000000	76000000	78333333
60%	109,2	59000000	65000000	55000000	59000000	62000000	58000000	59666667
70%	127,4	28000000	31000000	27000000	28000000	29000000	30000000	28833333
80%	145,6	157000	159000	161000	159000	160000	175000	161833
90%	163,8	0	0	0	0	0	0	0
100%	182,0	0	0	0	0	0	0	0
Control positivo PENICILINA	20 UI	0	0	0	0	0	0	0

Se determinó que el aceite esencial de *Cocos nucifera* presenta efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* a partir de la dilución del 50%, mostrando un halo de inhibición ≥ 18 mm, siendo sensible. Además, la concentración mínima bactericida se obtuvo en una concentración de 145.6 mg/dl, que equivale a una dilución del 80% y la dosis letal 50 en 91,0 mg/dl, que equivale al 50%. Lo que lleva a concluir que sí existe efecto antibacteriano del aceite esencial de *C. nucifera* sobre *S. mutans*.

Discusión

La fitoterapia ha ganado un lugar importante en el ámbito odontológico al incluir productos naturales con alta actividad terapéutica, menor toxicidad y mejor biocompatibilidad desde el punto de vista científico, en comparación con fármacos convencionales. Estas características hacen de esta terapia una buena alternativa para el tratamiento de patologías bucales como la caries dental, potenciando el uso de esta terapia y brindando apoyo a los profesionales odontológicos y sus pacientes. (Gomes et al., 2020)

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, sus consecuencias clínicas afectan directamente la calidad de vida de las personas. Así mismo, la atención odontológica requiere un alto costo y muchas veces está fuera del alcance de determinadas comunidades. Si bien esta enfermedad se produce por la interacción de diferentes factores, uno de ellos es el económico, por lo que se busca una alternativa medicinal de bajo costo, y el abordaje a su vez de otro factor, quizás el más importante, que implica el desarrollo y multiplicación del microorganismo iniciador de esta enfermedad que es *Streptococcus mutans*. (Sin et al., 2021)

En el estudio realizado por Vásquez & Guardia, realizaron doce réplicas por concentración de aceite de coco (25%, 50% y 75%). Obtuvieron un halo de inhibición de 17 mm a una concentración del 25% de aceite esencial, 21.75 mm al 50% y 22 mm al 75%. La concentración del 75 % mostró la media inhibidora más alta frente a *Streptococcus mutans* y fue la concentración inhibidora mínima que eliminó completamente las UFC. En el presente trabajo se determinó que el aceite esencial de *Cocos nucifera* tiene efecto antibacteriano frente al *S. mutans* y la sensibilidad bacteriana se presentó a partir de una dilución del 50% con un halo de inhibición de 18 mm, y al 70% 21 mm, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Vásquez & Guardia.

Baqer Lamyaa en 2020, realizó un estudio en donde *S. mutans* fue expuesto a concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%. Como resultado obtuvo los siguientes valores: 25% - 4mm, 50% - 10mm, 75% - 14mm, 100% - 18mm, correspondiendo el porcentaje a la concentración de aceite de coco y el siguiente valor al microorganismo. En esta investigación se presentaron halos de inhibición de mayor diámetro, obteniendo halos de 15 mm a una concentración del 30%, 18 mm al 50%, 21 mm al 70% y 25 mm al 100%, lo cual coincide en el efecto antibacteriano del aceite de coco frente a *S. mutans*, y difiere en el diámetro de los halos de inhibición.

Estudios *in vitro* realizados por Rajan et al., determinaron la actividad antimicrobiana del agua de coco y aceite de coco en 50 especies de *Candida*. Los resultados de los halos de inhibición fueron: al 100% del aceite de coco sin diluir se obtuvieron halos entre 12 - 16mm mientras que el agua de coco al 100% mostraron inhibición menos de 5mm y al 50% y al 25% de la concentración de agua de coco no hubo una zona de inhibición de las especies de *Candida*. En este estudio se ha demostrado una actividad inhibitoria por parte del aceite de coco contra las especies de *Candida*. En comparación con la presente investigación se observa que efectivamente el aceite de coco presenta propiedades antimicrobianas, resaltando que a diferencia del estudio de Rajan et al., trabajó con microorganismos pertenecientes a especies de *Candida*, en el estudio actual fue con *S. mutans*, microorganismo anaerobio facultativo, lo cual aporta ampliando las investigaciones sobre el efecto inhibitorio del aceite de coco frente a diversas bacterias.

Peedikayil et al., realizaron un estudio con una población de 50 niños entre edades comprendidas de 8 a 12 años, a los participantes se les dieron de 5 a 10 ml de aceite de coco/clorhexidina y se les pidió que lo agitaran por toda la cavidad bucal. Los resultados mostraron que el aceite de coco es tan eficaz como la clorhexidina para reducir a *S. mutans*. En comparación

con la presente investigación, se observa que efectivamente el aceite esencial de coco presente propiedades antibacterianas frente a *S. mutans*, microorganismo anaerobio facultativo y de principal importancia en la etiopatogenia de la caries dental, lo cual aporta ampliando las investigaciones sobre las propiedades bactericidas de esta planta medicinal.

Kaushik et al., (2016) realizaron un estudio controlado aleatorizado y seleccionaron 60 sujetos, los cuales se dividieron en tres grupos, el primer grupo realizó enjuagues con aceite de coco, el segundo con clorhexidina y el tercero con agua destilada. Los resultados evidenciaron una reducción estadística significativa sobre *S. mutans*, tanto en el grupo que utilizó aceite de coco como el de clorhexidina. Los resultados de este estudio son consistentes con esta investigación, en donde se encontró que el aceite esencial de *Cocos nucifera* tiene actividad antibacteriana frente a *S. mutans*.

Sari et al., (2019) comprobaron mediante un estudio que consistió en una muestra de microorganismos de cepas clínicas y de laboratorio la efectividad antibacteriana del aceite de coco virgen frente a *S. mutans*. La espuma del aceite de coco virgen (VCO) redujo significativamente el número de *S. mutans*, VCO demostró funcionar como un agente antibacteriano y antifúngico. Corroborando con los resultados obtenidos que este aceite sí presenta actividad antibacteriana, debido a sus componentes, principalmente el ácido láurico, y que a diferentes diluciones mejora su potencial antibacteriano.

Conclusiones

El aceite esencial de *Cocos nucifera* tiene efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*, lo cual se determinó mediante pruebas de sensibilidad microbiana y un estudio experimental *in vitro*, en el que se demostró que a partir de una dilución del 50% el aceite esencial de *C. nucifera* muestra efecto antibacteriano sobre *S. mutans* cepa ATCC® 25175TM, dilución que determina la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual presenta un halo de inhibición de 18 mm. Así mismo, se concluyó que la concentración mínima bactericida (CMB) es de 145,6 mg/dl, lo que equivale a una dilución del 80%, para eliminar el 99,9% de *S. mutans*, también se evidenció que la dosis letal 50 (DL50) fue de 91,0 mg/dl, para inhibir el 50% de UFC de *S. mutans*.

Recomendaciones

Se recomienda continuar realizando estudios con plantas medicinales que puedan contribuir en el cuidado de la salud oral, así como también, realizar estudios *in vitro* del aceite de *Cocos nucifera* frente a otros microorganismos que puedan ser patógenos en cavidad oral como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.

Se recomienda obtener aceite esencial de *Cocos nucifera* mediante diferentes métodos de extracción, con el fin de determinar el efecto antibacteriano y que su proceso de obtención sea más rápido. También seguir realizando investigaciones del efecto antibacteriano de otros aceites esenciales como eucalipto, tomillo, romero frente a *S. mutans*. Se sugiere realizar estudios sobre las propiedades antifúngicas y antivirales del aceite esencial de *Cocos nucifera*. Así mismo se recomienda continuar con la investigación hasta obtener un producto a base de aceite esencial de *Cocos nucifera* como un enjuague bucal, y de esta manera, llevarlo a la práctica clínica.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed, S., Mostafa, M., & El-Malt, M. (2020). Effect of Coconut Oil Pulling on Streptococcus Mutans Count in Saliva in Comparison with Chlorhexidine Mouthwash. *Al-Azhar Dental Journal for Girls*, 7(1), 7–11.
- Alban, G. P. G., Arguello, A. E. V., & Molina, N. E. C. (2020). Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación-acción). *Recimundo*, 4(3), 163-173.
- Aqawi, M., Sionov, R. V., Gallily, R., Friedman, M., & Steinberg, D. (2021). Anti-bacterial properties of cannabigerol toward *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Microbiology*, 12 (6), 1-15.
- Bohneberger, G., Machado, M. A., Debiassi, M. M., Dirschnabel, A. J., & Ramos, G. D. O. (2019). Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los? *Brazilian Journal of Health Review*, 2(4), 3504–351
- Baqer, L. K. (2020). Antibacterial activity of sesame oil and coconut oil against the cariogenic *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species-an in vitro study. *Connect journals*, 20 (1), 1961-1964.
- Beegum, P. S., Pandiselvam, R., Ramesh, S., Thube, S. H., Pandian, T. P., Khanashyam, A. C., Manikantan, M., & Hebbar, K. (2022). A critical appraisal on the antimicrobial, oral protective, and anti-diabetic functions of coconut and its derivatives. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 14(2), 86–100.

- Bukhari, S., Jabeen, S., Ayub, N., Awan, U. L., Fatima, S., & Ishteyaque, S. (2019). Screening of *cocos nucifera l.* as a solution to antimicrobial resistance. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 16(3), 775-782.
- Cerrato, M., Canales, D., Guevara, B., Chirinos, S., Ramirez, R. y Espinal, T. (2019, 18 julio). Frecuencia de caries dentales en pacientes de la clínica odontológica de la Universidad Tecnológica Centroamericana. *Innovare: Revista de ciencia y tecnología*, 8(1), 18-26.
- Chavez, S. G., Gómez, N. A., y Mestanza, M. (2022). Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Kunth en la estabilidad oxidativa de aceite de sachainchi (*Plukenetia hayllabambana*). *Revista chilena de nutrición*, 49(2), 173-180.
- Casasola - Bado, M. La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. (2022). *Revista Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 27(2), 89–98.
- Corrales Ramírez, L. C., Caycedo Lozano, L., y Quijano Duarte, S. (2022). Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. *NOVA: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 20(39), 121–150.
- Chambilla-Torres, K., y Sánchez-Tito, M. A. (2021). Efecto Antimicrobiano de Tres Cementos Selladores Endodónticos frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. *International journal of odontostomatology*, 15(3), 610-615.
- Cedeño, A. P. P., Moreira, C. A., Muñoz, J. P., Muñoz, A. C. P., Pillasaguay, S., y Riera, M. A. (2019). Comparación de métodos de destilación para la obtención de aceite esencial de eucalipto. *Revista Colón Ciencias, Tecnología y Negocios*, 6(1), 1-13.

- Condori, M., y Palomino, G. (2022). Rendimiento y caracterización fisicoquímica del aceite esencial de cilantro extraído por arrastre de vapor en un equipo modular. *Technological Innovations Journal*, 1(1), 41-53.
- Cayo-Rojas, C. F., Rojas-Zubizarreta, E. H., Nicho-Valladares, M. K., Ladera-Castaneda, M. I., y Aliaga-Marinas, A. S. (2021). Evaluación antibacteriana del peróxido de hidrogeno comparado con hipoclorito de sodio sobre cepillos dentales inoculados con *Streptococcus mutans*. *Revista Ciencias de la Salud*, 19(1), 1 – 11.
- Djais, A. A., Putri, N., Jemmy, Putri, A. R., Darwita, R. R., & Bachtiar, B. M. (2019). Effect of Propolis on *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 19(1), 1–9.
- Drummond-Suinaga, T., Rodríguez-Anderson, B., Galíndez-Landaeta, M. E., y Stanchieri-Andueza, M. (2022). Lectura interpretada del antibiograma. *Gaceta médica de Caracas*, 130(4), 856-866.
- Ferreira, E. D. S., Rosalen, P. L., Benso, B., de Cássia Orlandi Sardi, J., Denny, C., Alves De Sousa, S., Queiroga Sarmiento Guerra, F., de Oliveira Lima, E., Almeida Freires, I., & Dias De Castro, R. (2021a). The Use of Essential Oils and Their Isolated Compounds for the Treatment of Oral Candidiasis: A Literature Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021(3), 1–16.
- Fernández, E. G., y de Rebisso, M. C. (2019). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *annona muricata* (graviola) sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*. *Veritas*, 13(1), 111-116.

- Furtado, M. C. D. S., Castro, V., Oliveira, A. M., Santos, J. C. E., Silva, E. F. D., Bermúdez, V. M. S. y Nascimento, V. L. V. D. (2020). Caracterización fisicoquímica de aceites de frutos secos de coco (*Cocos nucifera L.*). *Research, Society and Development*, 9(9), 1-16.
- García-Jau, R. A., Gastelum-García, A., Chaidez-Angulo, A. L., Benítez-Pascual, J., Gastelum-García, V. G., y Valle-Urias, A. E. (2022). Presencia de *Streptococcus mutans* en saliva y caries dental en escolares. *In Conference Proceedings Jornadas Internacionales de Investigación en Odontología* 1(1), 1-6.
- Garófalo Sosa, J., Ponce-Molina, L., Noroña Zapata, P., y Campaña Cruz, D. (2020). Determinación de la dosis letal media (DL50) para mutaciones inducidas con rayos gamma en dos variedades de cebada (*Hordeum Vulgare L.*). *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 12(3), 58-71.
- Gajdács, M., Urbán, E. & Terhes, G. (2019). Microbiological and Clinical Aspects of Cervicofacial Actinomyces Infections: An Overview. *Dentistry Journal*, 7(3), 1-16.
- Gomes, MS, de Mendonça, AKP, Cordeiro, TO y Barbosa, MM (2020). Uso de plantas medicinais na odontologia: uma revisão integrativa. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*, 18 (2), 118-126
- Kania Tri Putri, D., Amirda, F., Muzadi, H., Nindia Carabelly, A., Erlita, I. & Rahmiati. (2020). The Antibacterial Activity of Actinomycetes Against the Growth of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. *BIO Web of Conferences*, 20(3), 1-5.
- Kaned, T. D., Paulkar, M. B., Jain, P. G., Bhandari, G. S., & Surana, S. J. (2021). *Cocos nucifera* pharmacological activities—An overview. *International Journal Doctrines of Integrative Medicine, Pharmacy and Science*, 1(1), 1-18.

- Kaushik, M., Reddy, P., Sharma, R., Udameshi, P., Mehra, N., & Marwaha, A. (2016). The effect of coconut oil pulling on *Streptococcus mutans* count in saliva in comparison with chlorhexidine mouthwash. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(1), 38-41.
- Lemos, J., Palmer, S., Zeng, L., Wen, Z., Kajfasz, J., Freires, I., Abranches, J. & Brady, L. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1), 1-18.
- Lima Illescas, M. V., Jiménez Jaramillo, D. J., Porrás Polo, C. A., Maurat Argudo, A. K., y Álvarez Álvarez, D. P. (2022). Efectos de azúcares totales sustitutos de sacarosa en la salud bucal. Revisión bibliográfica. *Revista Eugenio Espejo*, 16(2), 101-113.
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews microbiology*, 16(12), 745-759.
- Matangkasombut, O., Srithanyarat, S., Siripaiboonpong, N., Pengcharoen, H., Boonchaiyapluk, B., & Rujiraprasert, P. (2022). Microbiological Effects of Virgin Coconut Oil Pulling in Comparison with Palm Oil Pulling as an Adjunctive Oral Hygiene Care for Patients with Gingival Inflammation: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 26 (1), 58-63.
- Marqués Martínez, L., García Miralles, E., y Borrell García, C. (2021). Relación entre la caries dental y la adherencia a la dieta mediterránea en niños. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 41 (3), 105–110.
- Machado-Tan, T., y Reyes-Labarcena, B. (2021). *Streptococcus mutans*, principal cariogénico de la cavidad bucal. *Progaleno*, 4(3), 209-221.
- Matsumoto-Nakano, M. (2018). Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*, 54(1), 22-29.

- Ng, Y. J., Tham, P. E., Khoo, K. S., Cheng, C. K., Chew, K. W. & Show, P. L. (2021). A comprehensive review on the techniques for coconut oil extraction and its application. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(9), 1807-1818.
- Peedikayil, F. C., Remy, V., John, S., Chandru, T. P., Sreenivasan, P., & Bijapur, G. A. (2016). Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: An in vivo study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6(5), 447-452.
- Pinos, P. P., León, K. C., Bravo, P. O., y Tacuri, C. A. (2021). Métodos de diagnóstico microbiológico desde el punto de vista odontológico. *Revista Científica Universidad Odontológica Dominicana*, 9(1), 1-9.
- Qiu, W., Zhou, Y., Li, Z., Huang, T., Xiao, Y., Cheng, L., Peng, X., Zhang, L., & Ren, B. (2020). Application of Antibiotics/Antimicrobial Agents on Dental Caries. *BioMed Research International*, 20(20), 1–11.
- Romero-González, M. A. (2019). Azúcar y caries dental. *Revista Odontología Pediátrica*, 18(1), 4-11.
- Recalde, M. M., Mira, J. C., Esquivel, D. R. A., Miranda, P. G., y Gutierrez, R. L. (2018). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 29(2), 588-593.
- Rajan PD, Sumathi G & Nasimuddin. (2016). A study on in-vitro antimicrobial activity of Coconut water and coconut oil on *Candida* Species. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(12), 266-268

- Sari, LNI, Fauziah, E., Budiardjo, SB, Suharsini, M., Sutadi, H., Indiarti, IS & Rizal, MF (2019). Antibacterial and Antifungal Effectiveness of Virgin Coconut Oil (VCO) Mousse against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms. *Revista de investigación médica y dental internacional*, 12 (3), 917-922.
- Sánchez, B. M. M., Llanos, C. A. H., y Aristizabal, M. L. C. (2020). Actividad bactericida in vitro de *Chenopodium quinoa* Willd. y *Artemisia dracuncululus* L. sobre bacterias patógenas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 25(3), 1-18.
- Sun, Y., Jiang, W., Zhang, M., Zhang, L., Shen, Y., Huang, S., & Zhang, K. (2021). The inhibitory effects of ficin on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *BioMed Research International*. 2021(6), 1 – 11.
- Sundrasegaran, S. & Mah, S. H. (2020). Extraction Methods of Virgin Coconut Oil and Palm-pressed Mesocarp Oil and their Phytonutrients. *eFood*, 1(6), 381-391.
- Seher, F., Hosein, M., & Ahmed, J. (2018). Role of Coconut Oil Pulling On Oral Health – An Overview. *Journal of The Pakistan Dental Association*, 27(3), 94–99.
- Sin, C., Britos, M., Chamorro, E., Cáceres, M., Fernández, D., & Ortega, S. (2021). Essential oils with antibacterial activity: possible uses and administration in the dental practice. *Odontología Vital*, 2021(35), 32-43.
- Sáenz Rivera, E. D. J., Bañol Acevedo, E. M. y Rincón Rodríguez, R. J. (2021). SMU.759 que codifica para una proteasa similar a colagenasa es constitutivo en *Streptococcus mutans*. *Revista Nacional de Odontología*, 17(1), 1-11.

- Vásquez-Vereau, G., & Guardia-Méndez, G. (2021). Efecto Antibacteriano de Aceite de Coco (*Cocos nucifera*) Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175: Un Estudio *in vitro*. *International journal of odontostomatology*, 15(4), 922-927.
- Woolley, J., Gibbons, T., Patel, K., & Sacco, R. (2020). The effect of oil pulling with coconut oil to improve dental hygiene and oral health: A systematic review. *Heliyon*, 6(8), 1-7.
- Zhang, Z., Yang, Y., Sun, Q., Zeng, W., & Li, Y. (2022). Inhibition of Biofilm Formation and Virulence Factors of Cariogenic Oral Pathogen *Streptococcus mutans* by Shikimic Acid. *Microbiology Spectrum*, 10(4), 1 – 15.

Anexo A. Ficha técnica base de agar sangre



Base de Agar Sangre

Cat. 1108

Para el aislamiento, cultivo y detección de la actividad hemolítica de microorganismos exigentes

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Aislamiento selectivo	Microorganismos fastidiosos
Detección	Reacciones hemolíticas

Industria: Clínica / Test de susceptibilidad antimicrobianos



Principios y usos

La Base de Agar Sangre se utiliza para el aislamiento, cultivo y detección de las reacciones hemolíticas de microorganismos fastidiosos.

Es adecuado para el aislamiento y cultivo de una amplia variedad de microorganismos con difíciles características de crecimiento. Al añadir la sangre, se puede emplear para determinar reacciones hemolíticas.

La infusión de corazón y la peptona de carne son fuentes ricas de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El cloruro de sodio proporciona electrolitos esenciales para el transporte y el balance osmótico. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

La adición de sangre proporciona factores de crecimiento extra para microorganismo fastidiosos y es la base para determinar las reacciones hemolíticas. Los patrones hemolíticos pueden variar con el tipo de sangre o la base de medio utilizado. Por ejemplo, la sangre desfibrinada de oveja da mejores resultados para estreptococos del grupo A.

Fórmula en g/L

Agar bacteriológico	15	Peptona de carne	10
Cloruro sódico	5	Infusión de corazón	10

Fórmula típica g / L * Ajustada y/o suplementada según sea necesario para cumplir con los criterios de rendimiento.

Preparación

Suspender 40 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir asepticamente 5-10 % de sangre desfibrinada esterilizada, homogenizar y verter en placas de Petri. Hay que tener cuidado para evitar la formación de burbujas cuando se añade la sangre al medio, girar el frasco o botella suavemente para crear una solución homogénea. Si se desea, se puede añadir el Suplemento de Polienriquecimiento (Cat. 8011) para incrementar el crecimiento.

Instrucciones de uso

Para diagnóstico clínico, el tipo de muestra es secreciones del tracto respiratorio.

- Usar procedimientos estándar para obtener colonias aisladas a partir de las muestras.

- Incubar a 35±2 °C durante 24-48 horas.

- Dado que muchos patógenos requieren dióxido de carbono en el aislamiento primario, las placas pueden incubarse en una atmósfera que contenga aproximadamente 5-10% de CO₂.

Resultados:

1. Alfa-hemólisis: decoloración verdosa del medio.
2. Beta-hemólisis: zona clara alrededor de la colonia.

3. Gamma-hemólisis: no hay cambios.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Tostado	Rojo cereza opalescente	7,3±0,2

Test microbiológico

Condiciones de incubación: (35±2 °C, atmósfera de CO₂ /24-48 h).

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	Buen crecimiento	
Neisseria meningitidis ATCC 13090	Buen crecimiento	
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	Buen crecimiento	Beta hemólisis
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Buen crecimiento	Beta hemólisis
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	Buen crecimiento	Alfa hemólisis

Almacenamiento

Temp. Min.: 2 °C
Temp. Max.: 25 °C

Bibliografía

Snavely and Brahier A. J. Clin. Path. 33:511. 1 960. Hosty, Freeman and Irwin, Public. Health. Lab., 1953.
Schubert, Edwards and Ramsey J. Bact. 77:648, 1969. APHA Diagnostic Procedures and Reagents 3.a edition, 1961. Tharshis and Frish AM. J. Clin. Path. 21:101. 1951.

Anexo B. Ficha técnica caldo tioglicolato



Technical Data

Fluid Thioglycollate medium

M009B

Intended use

Fluid Thioglycollate Medium is used for sterility testing of biologicals and for cultivation of aerobes, anaerobes and microaerophiles as per British Pharmacopoeia.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Tryptone#	15.000
Yeast extract	5.000
Glucose monohydrate	5.500
Sodium chloride	2.500
L-Cystine	0.500
Sodium thioglycollate	0.500
Resazurin sodium	0.001
Agar	0.750
pH after sterilization (at 25°C)	7.1±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

- Equivalent to Pancreatic digest of casein

Directions

Suspend 29.25 grams (the equivalent weight of dehydrated medium per litre) in 1000 ml Water R/purified/distilled water. Heat to boiling to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Cool to 25°C and store in a cool dark place preferably below 25°C.

Note : If more than the upper one-third of the medium has acquired a pink-purple colour, the medium may be restored once by heating in a water bath or in free flowing steam until the pink-purple colour disappears.

Principle And Interpretation

Brewer (1) formulated Fluid Thioglycollate Medium for rapid cultivation of aerobes as well as anaerobes including microaerophiles by adding a reducing agent and small amount of agar. The British Pharmacopoeia (2) USP (10), EP (3) and AOAC (11) have recommended the media for sterility testing of antibiotics, biologicals and foods and for determining the phenol coefficient and sporicidal effect of disinfectants. However, it is intended for the examination of clear liquid or water-soluble materials.

Tryptone and yeast extract serves as a source of nitrogen, carbon, long chain amino acids, vitamins and other essential growth nutrients. Glucose monohydrate is the fermentable carbohydrate and energy source. L-cystine is the amino acid necessary for bacterial multiplication. Sodium thioglycollate and L-cystine act as a reducing agent lowering the oxidation-reduction potential by removal of oxygen. This condition helps to prevent the accumulation of peroxides which is toxic in nature. The SH group of cystine also neutralizes the antibacterial effect of mercurial preservatives and other heavy metal compounds which exert a bacteriostatic effect in the materials under examination. Any increase in the oxygen content is indicated by a colour change of redox indicator, resazurin to red (7,8,9). The small amount of agar helps in maintaining low redox potential for stabilizing the medium (6).

In sterility checking, when the sample contains preservatives, it is recommended to dilute the sample with this broth to reduce the toxicity and enhance the growth of contaminants, if any.

Type of specimen

Pharmaceutical samples for sterility testing

Specimen Collection and Handling:

For pharmaceutical samples, follow appropriate techniques for sample collection, processing as per guidelines (2) After use, contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

Warning and Precautions

Read the label before opening the container. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. Follow good microbiological lab practices while handling specimens and culture. Standard precautions as per established guidelines should be followed while handling specimens. Safety guidelines may be referred in individual safety data sheets.

Please refer disclaimer Overleaf.

Limitations :

1. It is intended for the examination of clear liquid or water-soluble materials.

Performance and Evaluation

Performance of the medium is expected when used as per the direction on the label within the expiry period when stored at recommended temperature.

Quality Control**Appearance**

Cream to yellow homogeneous free flowing powder

Colour and Clarity of prepared medium

Light straw coloured, clear to slightly opalescent solution with upper 10% or less medium pink-purple on standing.

Reaction

After sterilization, reaction of 2.92% w/v aqueous solution. pH : 7.1±0.2

pH

6.90-7.30

Growth Promotion Test

As per British Pharmacopoeia

Growth promoting properties

Clearly visible growth of microorganism comparable to that previously obtained with previously tested and approved lot of medium occurs at the specified temperature for not more than the shortest period of time specified inoculating ≤ 100 cfu (at 30-35°C for ≤ 3 days).

Stability test

Light yellow coloured clear solution without any precipitation sedimentation at room temperature for 7 days

Cultural Response

Cultural characteristics observed after an incubation at 30-35°C for not more than 3 days.

Organism	Inoculum (CFU)	Growth
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404 (00008*)	50 -100	luxuriant
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	50 -100	luxuriant
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 (00007*)	50 -100	luxuriant
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 23745	50 -100	luxuriant
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	50 -100	luxuriant
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 25923 (00034*)	50 -100	luxuriant
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538 (00032*)	50 -100	luxuriant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (00025*)	50 -100	luxuriant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (00026*)	50 -100	luxuriant
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	50 -100	luxuriant
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	50 -100	luxuriant
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (00013*)	50 -100	luxuriant

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (00012*)	50 -100	luxuriant
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9002	50 -100	luxuriant
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 (00031*)	50 -100	luxuriant
<i>Salmonella</i> Abony NCTC 6017 (00029*)	50 -100	luxuriant
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633 (00003*)	50 -100	luxuriant

Key : * Corresponding WDCM numbers.

Storage and Shelf Life

Store between 10-30°C in a tightly closed container and the prepared medium at 15-25°C. Use before expiry date on the label. On opening, product should be properly stored dry, after tightly capping the bottle in order to prevent lump formation due to the hygroscopic nature of the product. Improper storage of the product may lead to lump formation. Store in dry ventilated area protected from extremes of temperature and sources of ignition. Seal the container tightly after use. Product performance is best if used within stated expiry period.

Disposal

User must ensure safe disposal by autoclaving and/or incineration of used or unusable preparations of this product. Follow established laboratory procedures in disposing of infectious materials and material that comes into contact with sample must be decontaminated and disposed of in accordance with current laboratory techniques (4,5).

Reference

1. Brewer, 1940, J. Am. Med. Assoc., 115:598.
2. British Pharmacopoeia, 2020, The Stationery office British Pharmacopoeia
3. European Pharmacopoeia, 2020, European Dept. for the quality of Medicines.
4. Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd Edition.
5. Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Carroll, K.C., Funke, G., Landry, M.L., Richter, S.S and Warnock, D.W. (2015) Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Vol. 1.
6. MacFaddin J.F., 1985, Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
7. Marshall, Gunnison and Luxen, 1940, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 43:672.
8. Nungester, Hood and Warren, 1943, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 52:287.
9. Portwood, 1944, J. Bact., 48:255.
10. The United States Pharmacopoeia, 2019, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
11. Williams H., (Ed.), 2005, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 19th Ed., AOAC, Washington, D.C

Revision : 05/2021

Disclaimer :

User must ensure suitability of the product(s) in their application prior to use. Products conform solely to the information contained in this and other related HiMedia™ publications. The information contained in this publication is based on our research and development work and is to the best of our knowledge true and accurate. HiMedia™ Laboratories Pvt Ltd reserves the right to make changes to specifications and information related to the products at any time. Products are not intended for human or animal or therapeutic use but for laboratory, diagnostic, research or further manufacturing use only, unless otherwise specified. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for infringement of any patents.

Anexo C. Ficha técnica de la activación de *Streptococcus mutans*



MICROBIOLOGICS KWIK-STIK™

Laboratories throughout the world have been praising the KWIK-STIK™ for decades. That's because its simple, all-inclusive design makes life easier for laboratory technicians while reducing chances for errors. Each KWIK-STIK™ contains a qualitative lyophilized microorganism pellet, ampoule of hydrating fluid and inoculating swab. Everything you need to grow reference cultures for QC testing is included in this one handy device. Available in packs of 2, 6, or as a QC set, KWIK-STIKs are universally used for all types of microbiological control testing.

Simple, Reliable, Qualitative QC Microorganisms

- Extensive, diverse collection of strains available
- All-in-one design reduces the risk of contamination
- Ready-to-use format saves you time and money
- Online Certificate of Analysis provides detailed strain information
- Traceability to reference cultures ensures authenticity
- Technical Support experts available for guidance

microbiologics.com

KL796 Rev C

HOW TO USE KWIK-STIK™

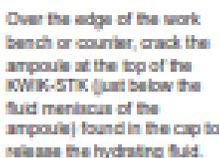
- 1**



Allow the unopened KWIK-STIK pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK unit.
- 2**



Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble and device during hydration.
- 3**



Over the edge of the work bench or counter, crack the ampoule at the top of the KWIK-STIK (just below the fluid meniscus of the ampoule) found in the cap to release the hydrating fluid.
- 4**



Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of the fluid through the shaft into the bottom of unit where the pellet is contained.
- 5**



Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the pellet suspension is homogenous.
- 6**



Immediately heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to the appropriate agar medium, or use according to the laboratory's SOP.
- 7**



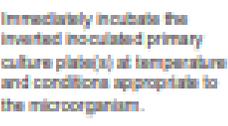
Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
- 8**



Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 9**



Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK.
- 10**



Immediately incubate the inverted inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

Culture method can be found on the product's page at microbiologics.com

For more information, visit us at www.microbiologics.com!

Anexo D. Evidencia Fotográfica



Foto 1. Activación de la Cepa ATCC® 25175TM



Foto 2. Siembra de *S. mutans* en Agar sangre de cordero.



Foto 3. Desprendimiento de la copra del *Cocos nucifera*.

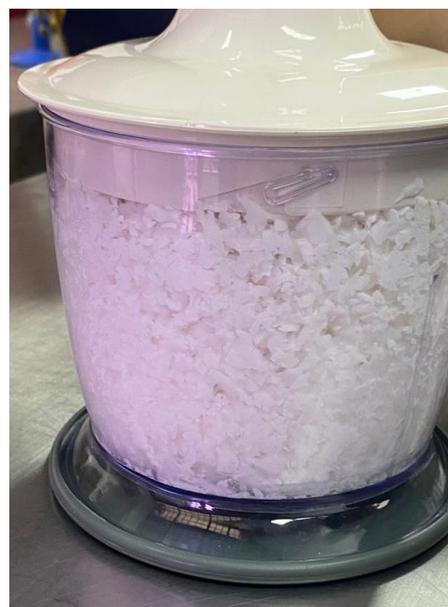


Foto 4. Trituración de los trozos de *Cocos nucifera*.



Foto 5. Destilación por arrastre de vapor de agua mediante sistema Soxhlet.



Foto 6. Obtención de aceite esencial de *Cocos nucifera*.



Foto 7. Preparación de medios de cultivo.



Foto 8. Agregación de Agar sangre de cordero a las cajas de Petri.



Foto 9. Siembra del microorganismo para hallar CMI.



Foto 10. Halos de inhibición.



Foto 11. Medición de halos de inhibición (CMI)



Foto 12. Patrón de turbidez de 0.5 de McFarland

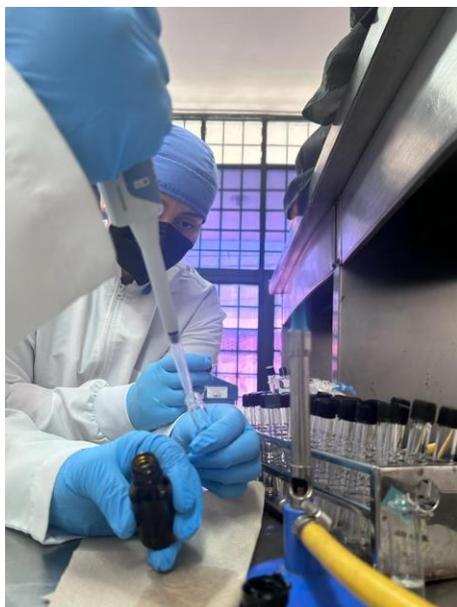


Foto 13. Diluciones del aceite de *Cocos nucifera* a diferentes concentraciones, para hallar DL50 y CMB.



Foto 14. Unidades Formadoras de Colonias (UFC).