



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DPTO. FORMACIÓN INTEGRAL DEL HOMBRE
INFORME DE INVESTIGACIÓN

**EL NEEM (Azadirachta indica) COMO ALTERNATIVA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA GINGIVITIS ASOCIADA A PLACA**

(Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo Período 2005-2006)

AUTORA:

Rígano I, Adriana I.

TUTOR METODOLOGICO:

Sanabria, Zulayma

TUTOR DE CONTENIDO:

Arias, Daniel

Valencia, Marzo 2006



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DPTO. FORMACIÓN INTEGRAL DEL HOMBRE
INFORME DE INVESTIGACIÓN

CARTA DE APROBACIÓN

En carácter de tutores de del trabajo final de Investigación Titulado:

EL NEEM (Azadirachta indica) COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE LA GINGIVITIS ASOCIADA A PLACA

(Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo Período 2005-2006)

Presentado por la bachiller: Adriana Isabel Rígano Izquier CI 16.596.504, consideramos que dicho trabajo de Investigación reúne los requisitos y méritos suficientes para ser aprobado y sometido a presentación pública y evaluación.

En la ciudad de Valencia, a los ____ días del mes de Abril de 2006.

TUTOR DE CONTENIDO

TUTOR METODOLÓGICO

DEDICATORIA.

A Dios por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta Facultad...

A mis padres Isabel y Carmelo, por su incondicional apoyo y cariño, y por darme las oportunidades de crecer y mejorar tomada de sus manos...

A mi hermana Carlota Isabel, por escuchar los Ramones cada vez que me encontraba trabajando en mi investigación...

A mi Anzozzo que se fue...

A mis nonnos y abuela...

A mis tías: Maria R. de Guanique, Alfredo Guanique e Iraida Izquier...

A mis primos, en especial: Luis Fernando Guevara y Gustavo Guanique...

A mis compañeros de clase: Javier, Juan Carlos, Nieves, Eliana, Genifer, Chabeliz y Lucimar por su gran amistad...

A José Felipe Romero y Lorna Villalobos por estar conmigo en todos los momentos...

A Maritza Chirivella por ser tan incondicional durante todos estos años...

A todos mis amigos músicos por su apoyo y gran cariño, en especial: Pedro Quintero, 7mo Sentido y Jesús Arteaga...

A mis viejos amigos, quienes siempre han estado para mí: Fanny Pérez, Fannisle Rosales, Alexander Gravis, Daniel Moreno, Victor Hugo Parra, Flia. Méndez Cárdenas...

A mis profesores por su colaboración y comprensión en momentos difíciles, en especial a: Belkis Dommar, Jorge Oliveros, Oscar Mora, Ma Elena Machado, Melba Oviedo, Gabriel Berrios y Susan León...

Adriana I. Rígano I.

RECONOCIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT), en especial al Dr. Daniel Arias, Willmer Acosta y Víctor Pérez, por el gran aporte científico que brindaron al presente trabajo...

A la Unidad de Microbiología Ambiental (UMA), especialmente al Dr. Luis Medina y Noja Nizzeddin...

Al Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social núcleo Maracay, Edo. Aragua, en especial al Lic. Juan Uztaris por su colaboración...

Al Departamento de Idiomas de Fundametal, especialmente a Inés Pereira por su comprensión y ayuda...

A la profesora María Elena Labrador por su dedicación y paciencia...

A todos los profesionales y amigos que hicieron posible la realización de éste trabajo...

Adriana I. Rígano I.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
RECONOCIMIENTO.....	ii
INDICE GENERAL.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I. EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema	4
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Justificación de la Investigación	8

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

Antecedentes de la Investigación	11
Bases teóricas	16
Evolución de los trastornos periodontales.....	16
El Neem.....	40
Dentífricos y colutorios.....	58
Métodos de análisis y procesamiento químico y microbiológico.....	65
Definición de términos.....	97
Lista de especificaciones	101

CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación	104
Diseño de la Investigación	104

Población y Muestra.....	105
Instrumentos de recolección de datos.....	105
Técnica de análisis.....	106

CAPITULO IV. PARÁMETROS A SEGUIR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN IDEAL DE ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE NEEM A TRAVÉS DE UN ESTUDIO IN VITRO.

Desarrollo de Aceite esencial puro de hojas de Neem.....	107
Extracción de la hoja con solvente.....	107
Prueba de HPLC.....	109
Análisis del aceite esencial.....	110
Recursos físicos y humanos.....	112
Recursos económicos.....	112
Determinación de concentración ideal de aceite esencial.....	114
Procedimiento. Macrodilución por contacto en anaerobiosis.....	114
Recursos físicos y humanos.....	115
Recursos económicos.....	116

CAPITULO V. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Ensayo piloto. Macrodilución por contacto en anaerobiosis.....	125
Análisis de los resultados.....	127
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	133
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
ANEXOS.....	138

LISTA DE FIGURAS

		p.p.
FIGURA Nº 1:	Curva de calibración de Azadiractina. Investigación de Arias, D. (2005)	110
FIGURA Nº 2:	Curva de Calibración de Azadiractina del extracto obtenido.	117
FIGURA Nº 3:	Cromatograma del aceite esencial de la hoja de Neem	117
FIGURA Nº 4:	Hojas de Neem en botellas de muestreo con etanol agregado	118
FIGURA Nº 5:	Botella de muestreo Tipo Wheaton calibrada (300 ml)	118
FIGURA Nº 6:	Proceso de agitación (24 horas)	119
FIGURA Nº 7:	Embudo de separación. Fase orgánica y fase acuosa del aceite esencial.	119
FIGURA Nº 8:	Obtención de la fase orgánica	120
FIGURA Nº 9:	Destilación de la fase orgánica en el Rotaevaporador	120
FIGURA Nº 10:	Fase orgánica en el proceso de destilación	121
FIGURA Nº 11:	Solvente destilado del aceite	121

FIGURA Nº 12:	Obtención del aceite esencial puro de hojas de Neem. Envasado en frasco de color ámbar.	122
FIGURA Nº 13:	Preparación de la solución para la corrida cromatográfica	122
FIGURA Nº 14:	Solución lista para el análisis	123
FIGURA Nº 15:	Colocación de la muestra en el cromatógrafo líquido HPLC	123
FIGURA Nº 16:	Observación de la corrida cromatográfica en el equipo	124
FIGURA Nº 17:	Pool bacteriano (m. bucales), elaborado de una muestra obtenida de los espacios interdetales	128
FIGURA Nº 18:	Introducción de caldo tioglicolato en los tubos	128
FIGURA Nº 19:	Toma de muestras del Pool bacteriano para su introducción en los tubos con caldo tioglicolato.	129
FIGURA Nº 20:	Tubos con parafina.	129
FIGURA Nº 21:	Elaboración de Suspensión de aceite esencial de hojas de Neem al 2%.	130

FIGURA N° 22:	Tubos preparados para el monitoreo.	130
FIGURA N° 23:	Crecimiento bacteriano a 1 minuto.	131
FIGURA N° 24:	Crecimiento bacteriano a los 5 minutos.	131
FIGURA N° 25:	Crecimiento bacteriano a los 15 minutos.	132
FIGURA N° 26:	Crecimiento bacteriano a los 30 minutos.	132

LISTA DE TABLAS

		p.p.
TABLA N° 1:	Estimado de gastos para la obtención y análisis de aceite esencial puro de hojas de Neem.	113
TABLA N° 2:	Estimado de costo. Prueba de Macrodilución por contacto en UMA (Unidad de Microbiología Ambiental)	116
TABLA N° 3:	Evaluación bactericida de Aceite de hojas de Neem. Macrodilución por contacto en anaerobiosis.	127



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DPTO. FORMACIÓN INTEGRAL DEL HOMBRE
INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**EL NEEM (Azadirachta indica) COMO ALTERNATIVA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA GINGIVITIS ASOCIADA A PLACA**

(Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo Período 2005-2006)

AUTORA:

Rígano I , Adriana I.

TUTOR METODOLOGICO:

Labrador, María

TUTOR DE CONTENIDO:

Arias, Daniel

Fecha: Abril 2006

RESUMEN

El objetivo general del presente trabajo fue analizar las propiedades químico/biológicas del Neem como alternativa para el tratamiento de la gingivitis asociada a placa, con el fin de proponer criterios para la determinación de la concentración ideal del aceite esencial puro de hojas de Neem a través de un estudio In Vitro. y de esta forma determinar la importancia del estudio de la planta por medio de una propuesta para la realización de un estudio In Vitro. La modalidad de esta investigación es de tipo Proyecto Factible fundamentada en un proyecto de desarrollo tecnológico, mediante la elaboración de un aceite esencial, y posterior evaluación de la propiedad antibacteriana del mismo a través de un estudio de factibilidad funcional. Se obtuvo el aceite esencial por medio de extracción de la hoja con solvente orgánico, y se realizó una Prueba HPLC para evaluar la presencia de compuesto activo, cuya cantidad fue 1980 mg/300 grs de hojas. Posteriormente, se elaboró un ensayo piloto In Vitro con la finalidad de evaluar la factibilidad funcional, elaborando una solución de Aceite de Neem al 2%, y exponiendo la misma a cuatro tubos de ensayo preparados con bacterias bucales en anaerobiosis, lo cual dio como resultado una inhibición del crecimiento bacteriano a los 15 minutos de contacto.

Palabras clave: Neem, Azadiractina, Acción bactericida.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad de plantas y sus utilidades en la terapia de salud, han sido estudiadas desde hace décadas; incluso, existen indicios que revelan el conocimiento milenario de las facultades curativas de diversas especies de plantas en los seres humanos. La utilización de éstas plantas como materia prima para la obtención de sustancias es conocida y utilizada; por este motivo, existen en la actualidad numerosos productos naturales en el mercado.

En los últimos años, la Odontología ha incluido el uso de productos basados en componentes activos de origen natural, muchos de los cuales se encuentran en estudio en estos momentos, así como se considera la inclusión de otras sustancias de este tipo como alternativa al tratamiento odontológico; este ha sido caso del Neem, una planta proveniente de la India, acerca de la cual se reportan muchas facultades, siendo conocida y venerada por los hindúes desde tiempo antiguos. La tradición del Neem ha sido transferida por generaciones debido a su aparente poder medicinal, ya que es utilizada para múltiples finalidades, tales como: Enfermedades digestivas, respiratorias, cutáneas, y también en diabetes, así como se estudia su propiedad anticonceptiva, entre otras como antiinflamatoria, antimicrobiana, antifúngica, y en la actualidad se estudia su propiedad antiviral.

Numerosos investigadores han evaluado a su vez, la propiedad plaguicida de la planta, y es por esta razón que el uso de fertilizantes a base de Neem en la industria agropecuaria es muy conocido en nuestros días.

De la misma forma, la repercusión odontológica del Neem en la India ha sido estudiada con anterioridad, esto motivado a la costumbre de los pobladores de limpiar sus dientes con tallos y hojas de la planta,

observándose en ellos un bajo índice de caries y enfermedad periodontal. Es por esto que, en estas regiones, se elaboran una serie de productos a base de Neem, entre ellos cremas dentales y enjuagues bucales, entre otros productos. Aunado a esto, la exportación de la planta es también un mercado para los pobladores de la India.

El uso del Neem en la gingivitis ha sido estudiado con anterioridad; sin embargo, las fundamentaciones en cuanto a su acción no están claras, y por ende, la apertura de otros estudios en la actualidad pretende encontrar las respuestas a las múltiples interrogantes acerca de su acción y efectividad. En relación a lo anterior, se presenta la siguiente investigación, la cual está enfocada a la evaluación de la propiedad bactericida del Neem para ser considerado una alternativa terapéutica en el tratamiento de la gingivitis asociada a placa.

De una manera sencilla y detallada, se plantean, al principio de este trabajo, los objetivos, generales y específicos que se persiguen durante el desarrollo investigativo. Así como el planteamiento del problema refleja, de manera concisa, la relación existente entre la gingivitis asociada a placa y la propiedad bactericida del Neem como punto de partida para este estudio.

En el segundo capítulo, se presentan las bases teóricas relacionadas a este estudio, así como una cantidad de antecedentes teóricos relacionados con las variables manejadas a lo largo de este estudio.

En el tercer capítulo se indica la metodología empleada, en relación con el tipo y diseño de la investigación; también, se plantean, de forma generalizada, las fases que se llevarán a cabo a lo largo de la misma.

En el cuarto capítulo se explican detalladamente los pasos seguidos durante cada uno de los procedimientos realizados durante el trabajo,

seguido de la presentación y análisis de los gráficos y tablas que reflejan los resultados obtenidos a lo largo del procedimiento.

En el quinto capítulo, se muestran las conclusiones y recomendaciones con respecto a los resultados observados en el cuarto capítulo.

Por último, en el sexto capítulo, se presenta la propuesta planteada en base a los resultados y conclusiones, indicando así los procedimientos a seguir posteriormente

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La medicina alternativa es utilizada como complemento de la medicina convencional. Métodos tales como la aromaterapia, la acupuntura, homeopatía y la naturopatía, son prescritas en conjuntos con la medicina convencional. Las terapias biológicas en la medicina complementaria y alternativa emplean sustancias que se encuentran en la naturaleza, entre estas se utilizan hierbas, alimentos y vitaminas. Algunos ejemplos incluyen el uso de suplementos dietéticos, el uso de productos de herboristería de otras terapias denominadas "naturales" aunque su efectividad no haya sido comprobada desde el punto de vista científico.

Durante los últimos años, en el campo odontológico, así como en la medicina, se han incorporado estas terapias anteriormente mencionadas de manera progresiva; estudios recientes han revelado las propiedades de una planta Hindú denominada Neem, para combatir, entre otras patologías, la lepra, la malaria, diabetes, úlcera, hiperglucemia, eczemas y otras enfermedades de la piel, trastornos intestinales y las enfermedades bucales, entre las que se citan la gingivitis y los trastornos periodontales.

En otras culturas, el Neem ha sido utilizado en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Como se dijo anteriormente, parece poseer una

propiedad antibacteriana, y su acción contra la gingivitis y la enfermedad periodontal ha sido aprovechada. En zonas como la India, y sureste de Asia, millones de personas utilizan ramas y hojas de Neem para cepillar sus dientes, y mantener sus encías libres de enfermedades e infecciones, ya que estos pobladores tienen acceso limitado a cuidado dental moderno. Por esta razón, la efectividad del Neem está siendo evaluada de forma científica en estos países, en donde algunos productos tales como jabones, enjuagues bucales, pastas dentales, etc. han sido elaborados a base de la corteza, hojas, y semillas de Neem.

Algunos artículos realizados en Europa y Asia han señalado que la corteza del Neem es más activa que las hojas y ramas, y que aquellos productos basados en Neem provocaron la disminución de exudado purulento, y otros estudios demostraron que las pastas dentales a base de Neem mejoraron y hasta revirtieron el proceso de gingivitis. Sin embargo, y a diferencia de lo anteriormente planteado, algunos trabajos de investigación de Venezuela, han señalado que el aceite esencial de hojas de Neem posee gran cantidad de compuesto activo, y que este a su vez, puede ser utilizado de manera provechosa.

Las utilidades identificadas en la literatura, señalan también, la efectividad del Neem en la prevención de caries dental. Con respecto a esto, Navarro, F. (2006) publicó un artículo en el semanario mexicano Primera Plana titulado *Explotan propiedades del árbol de Neem*, en cuyo tercer párrafo la investigadora María Magdalena Espinoza Álvarez menciona el descubrimiento fortuito de sus propiedades debido a la proliferación de una plaga en India la cual exterminó todas las áreas verdes, a excepción del árbol de Neem, y, a partir de ése momento, inició el interés por estudiar la planta; debido a esto, en el ámbito popular comenzaron a tallar los dientes y encías con las hojas de la planta, y observaron que las infecciones, inflamaciones y dolores producidos por caries u otras afectaciones desde el punto de vista bucal, paulatinamente

desaparecieron. Lo anterior, refiere que el uso de esta planta como método preventivo y terapéutico en gingivitis y periodontitis se registra en otras culturas. Sin embargo, los usos del Neem como medicina botánica en la terapéutica de la gingivitis y enfermedad periodontal carece de conocimiento y popularidad en Venezuela, por lo tanto, durante la elaboración de éste proyecto se estima la profundización y experimentación de ésta terapia. El uso de Neem en Venezuela se ha limitado a la industria agrícola y preservación ecológica, en donde se reconoce su acción como plaguicida; sin embargo su uso en Odontología, no se ha desarrollado.

En cuanto a la sintomatología, los trastornos periodontales constituyen una enfermedad de gran importancia en Odontología y, de forma concreta en el área de Periodoncia, lo cual confiere especial importancia a los hallazgos anteriormente descritos. En base a esto, debe ser acotado que ciertos signos y síntomas específicos se observan en los pacientes que padecen de gingivitis, tales como: Inflamación gingival, hemorragia espontánea o provocada, encías eritematosas, presencia de factores irritantes, cambios de consistencia y textura de la encía, entre otros, los cuales justifican la instalación de la enfermedad, y en consecuencia el padecimiento de gingivitis. En tal sentido, se han planteado alternativas de solución para el tratamiento de la gingivitis, entre los cuales se puede mencionar las profilaxis dentales, tartrectomías manuales y ultrasónicas, el uso (o restricción de consumo) de ciertos fármacos, y se cita de igual forma el tratamiento alternativo. Estudios realizados señalan que, entre otros efectos, el Neem posee propiedades antisépticas, antibacterianas y antiinflamatorias asociadas las distintas partes de la planta, lo cual constituye un aspecto importante para ser considerada un coadyuvante en el tratamiento gingival, debido a la influencia bacteriana de los trastornos periodontales, por lo tanto este aspecto es considerado el enfoque central de este estudio.

La presencia de compuestos activos de gran importancia han sido el gatillo para investigaciones en distintas áreas diferentes a la odontológica. Sin embargo, el estudio de las facultades de dicha planta puede ser considerado una oportunidad terapéutica en Periodoncia, por lo cual surge la siguiente interrogante: ¿Pueden las propiedades del Neem ser consideradas como alternativa para el tratamiento de la gingivitis asociada a placa?, por lo tanto, la finalidad de éste estudio es analizar las propiedades químico/biológicas del Neem como alternativa para el tratamiento de la gingivitis asociada a placa.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Analizar las propiedades químico/biológicas del Neem como alternativa para el tratamiento de la gingivitis asociada a placa.

Objetivos específicos

1. Determinar la importancia del Neem en el tratamiento de la gingivitis asociada a placa, mediante un estudio diagnóstico de la necesidad.
2. Establecer la factibilidad económica en función del costo/beneficio de la elaboración de un estudio In Vitro.
3. Establecer el procedimiento a seguir para la obtención del aceite a base de hojas de Neem.
4. Detectar la presencia de compuestos activos en el aceite obtenido.

5. Evaluar la actividad bactericida del aceite a base de hojas de Neem sobre los microorganismos anaeróbicos, a través de un estudio de factibilidad funcional
6. Proponer criterios para la determinación de la concentración ideal de aceite esencial a través de un estudio In Vitro.

Justificación

Las aplicaciones del Neem en la salud bucal han dado resultados favorables. En la cultura hindú, su poder curativo es reconocido y venerado. En relación a esto, numerosos estudios científicos se han elaborado, siendo enfocados, en su mayoría al sector agrícola; se conocen pocos estudios científicos en relación a su uso en la terapéutica de enfermedades humanas. En tal sentido, los trabajos sobre su aplicación para el tratamiento odontológico son escasos, y algunos de los estudios realizados resultan poco específicos, lo cual refiere una falta de información basada en la ciencia.

Por otro lado, se han identificado algunos productos dentales en el mercado, cuya composición activa de extracto de Neem suele ser 3%; con respecto a esto, no se encuentra fundamentación científica que señale dicha concentración como terapéutica ideal para el alcance del efecto deseado evitando aparición de efectos colaterales. La existencia de otros enjuagues bucales a base de Neem elaborados de forma empírica es referida en el mercado internacional, ya que estos no presentan composición química, especificaciones o dosificaciones que indiquen la formulación o uso correcto del producto, respectivamente. Aunque estos estudios de investigación y algunos productos han sido elaborados en otras partes del mundo (México, en mayor escala), la consideración del Neem como alternativa en la terapia odontológica en Venezuela no se ha

estudiado aún, y concretamente, su posibilidad de uso en el tratamiento de la Gingivitis asociada a placa no ha sido considerada.

Existen estudios realizados In Vitro, que señalan el poder bactericida del extracto de Neem en bacterias aeróbicas patógenas tales como E. coli y S. typhimurium; al respecto, no se señalan estudios realizados en bacterias periodontopatógenas u otro estudio in Vitro relacionado a bacterias bucales.

Por último, los recursos humanos, representados por profesionales especializados en cuanto a ésta área son encontrados en el país, encontrándose muchos de ellos en esta Universidad; por lo tanto, se cuenta con expertos químicos quienes han estudiado, y aún estudian las características químicas de la planta, publicando artículos acerca de sus avances, y elaborando otras investigaciones al respecto, aún en la actualidad.

De igual forma, el avance en cuanto al estudio de las propiedades del Neem se realiza con la finalidad de incluir sus compuestos activos en soluciones tópicas que representen una opción terapéutica para el tratamiento de la Gingivitis asociada a placa. Mediante el estudio de factibilidad económica se busca la consideración del procesamiento del Neem como una alternativa de bajo costo y considerable factibilidad. La existencia de otros productos en el mercado para el tratamiento de la Gingivitis asociada a placa es un factor a tomar en cuenta; sin embargo, muchos de estos productos, en especial los de mayor repercusión clínica suelen ser costosos y por lo tanto no se encuentran al alcance de todos los estratos sociales. Este factor abre las puertas a la consideración de otras opciones de menor costo para la población.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, éste estudio persigue la propuesta de un estudio in vitro con el fin de evaluar la propiedad antibacteriana del Neem (*Azadiracta indica*) sobre bacterias bucales

periodontopatógenas, para de esta forma considerar, mediante una base científica, el uso de esta planta, como alternativa terapéutica en la Gingivitis asociada a Placa. Por otro lado, este trabajo constituye un aporte técnico, mediante el cual se propone el procedimiento a seguir para la elaboración un estudio in Vitro exponiendo la fases de diagnóstico, factibilidad económica, desarrollo, y factibilidad funcional del mismo.

Por otro lado, esta investigación contribuirá desde el punto de vista práctico, ya que se exponen (1) el avance realizado en cuanto al procedimiento químico de extracción del aceite esencial y; (2) el ensayo in Vitro llevado a cabo durante el estudio de factibilidad funcional, por lo cual se propone la profundización y expansión en la ejecución de estos procedimientos, para la obtención de resultados de validez e importancia, los cuales representen un avance de mayor importancia.

De igual forma, esta investigación pretende complementar la información obtenida previamente en el país y el mundo con respecto al tema, enfocándose en aproximaciones compatibles con el área odontológica, y concretamente Periodoncia, lo cual servirá como aporte importante a la comunidad científica de la Facultad, Venezuela y el mundo.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

En Washington, Shultz, E. et al (1992) en un libro publicado llamado *Neem, a tree for solving global problems* se explica el uso del Neem al combatir trastornos gingivales y periodontales, así como también se menciona su propiedad antibacteriana, así como se describe la planta, y se mencionan sus otros múltiples usos.

Seguido a esto, Jacobson, A (citado por Montañez, 2005) refiere que en investigaciones realizadas en la Planta de Cuidado de Salud de México, con el propósito de demostrar las propiedades de los plaguicidas biorracionales, encontró que: no presentan ningún riesgo al ambiente o su riesgo es mínimo debido a su composición química. Presentan un control efectivo y se requieren concentraciones bajas de producto; son muy seguros para los operadores y son compatibles con sistemas de manejo integrado de plagas debido a su selectividad y corta residualidad.

Por su parte, Villalobos O., Salazar C., y Ramírez de Sánchez G. (2001) en un estudio titulado *Efectos de un enjuague bucal compuesto de aloe vera en la placa bacteriana e inflamación gingival* [Documento en línea] Disponible: http://www.actaodontologica.com/39_2_2001/efecto_enjuague_bucal.aspe [Consulta: 2006, Enero 29], se tomó registro de inflamación gingival e índice de placa en dos grupos: control y

experimental. Los enjuagues, experimental y placebo, fueron preparados en el Departamento de Galénica, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Venezuela, Estado Mérida, permitiendo concluir que, en el contexto de esta investigación, el gel de áloe vera utilizado en la composición del enjuague bucal experimental a un 50% de concentración disminuye la cantidad de placa y la inflamación gingival.

Osuma, M. (citado por Montañez, 2005) refiere estudios realizados por este autor acerca del contenido de aceite de las semillas de neem, con el objetivo de determinar su aplicabilidad en la elaboración de diferentes productos. Se realizaron procesos de extracción sólido-líquido que le permitieron concluir que las semillas de neem poseen un 40% de aceite, el cual puede ser utilizado como combustible para las lámparas y como lubricante para las máquinas; a la vez que es considerado un ingrediente útil en jabones, desinfectantes, productos farmacéuticos y de cosmetología.

En ése mismo año, Gispert Abreu, E. et al (2001) en el Centro Provincial de Investigaciones Estomatológicas llevaron a cabo un estudio denominado *Evaluación de una crema dental con extracto de cuproclorofila*, publicado en la Revista Cubana Estomatológica Vol 38 (3) pags 149-154 [Documento en línea] Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/est/vol38_3_01/est01301.htm [Consulta 2006, Marzo 11]. En este trabajo “se evaluó el efecto del cepillado con crema dental que contiene extracto de cuproclorofila en 23 niños de 10 años (otros 23 niños se tomaron como control). Se observaron reducciones significativas según chi cuadrado en cuanto a la infección por *Streptococcus mutans*, la acumulación de placa dentobacteriana y en la inflamación gingival del grupo tratado con respecto al control”. El autor señala, que “La clorofila se ha utilizado desde hace bastante tiempo en enjuagatorios y como componente de cremas dentales en numerosos países.

Angulo M., (2003) en su investigación titulada *Eficacia de nuevos bioplaguicidas formulados a partir de neem (Azadirachta indica Juss) y venadillo (Swietenia humilis Zucc)* [Documento en línea] Disponible: <http://www.ciad.edu.mx/salima/display1.asp?func=display&resid=53&tree=624> [Consulta: 2006, Enero 29]. Se expone la aplicación del Neem en la agricultura, en donde se expresa que “El poder insecticida que presenta las semillas de neem presente en Sinaloa es similar al observado al neem producido en India”, y se observó que la aplicación de un plaguicida elaborado a base de Neem denominado Bioneem en un sembrado de tomate reveló que el porcentaje de plantas con presencia de virosis (enfermedad transmitida por un insecto denominado mosquita blanca) se redujo significativamente en los tratamientos con este producto.

Por otro lado, Cháides-Quiroz C., Jackez-Coronel, I., Rubio-Carrasco W., Angulo-Escalante M. (s.f), llevaron a cabo una investigación titulada *Actividad Bactericida de Extractos Acetónicos de Semillas de Swietenia humilis y Azadirachta indica Juss. contra Escherichia coli y Salmonella typhimurium*, Departamento de Seguridad Alimentaria, CIAD-Unidad Culiacán. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, UAS [Documento en línea] Disponible: <http://www.ciad.mx/boletin/mayjun02/Actividad%20Bactericida.PDF> [Consulta 2006, Enero 30], cuyo objetivo general fue “evaluar la actividad bactericida de extractos acetónicos de semillas de Venadillo y Neem contra Escherichia coli y Salmonella typhimurium”. Los resultados de este estudio muestran que “el Neem y Venadillo poseen un efecto bactericida. En este sentido se observó que los extractos naturales fueron capaces de reducir hasta un 99 % de una concentración inicial de bacterias (*E. coli* y *S. typhimurium*) después de un tiempo de contacto de 5 minutos”.

En cuanto a los diversos métodos para extraer el compuesto activo a base de Neem, se cita Williams, D. (2004), quien registra un procedimiento en The United States Patent Application, bajo el Código 20040116719 [Documento en línea en línea] Disponible en:

<http://www.uspto.gov> [Consulta: 2006, Marzo 21]. Esta patente tiene por título *Método de extracción*; en éste material se presenta un método para tratar una fuente de Azadiractina, y de esta forma: (a) disolver dicha fuente en un solvente polar orgánico; (b) combinar la solución de paso; (c) Tratar dicha fase o paso; (d) Recuperar uno o ambas fases acuosas y la fase que contiene el solvente polar orgánico.

El trabajo de Hernandez Sánchez M., y Aguilar Orozco S., (2004) titulado *Reducción de inflamación gingival con Neem (Azadirachta indica L.)* estudio experimental realizado en la Unidad académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Nayarit, México [Documento en línea] Disponible: <http://www.cocyten.gob.mx/desc/ARTICULO2004TCM07M.pdf> [Consulta: 2006, Enero 30], con el propósito de evaluar la efectividad que ejercía el extracto de Neem en el control de la gingivitis enfocando el estudio en comparación con los efectos de la clorhexidina. Se compararon cuatro tipos diferentes de tratamiento, y los resultados arrojaron que todos los tratamientos fueron efectivos significativamente en la disminución de la placa bacteriana, el sangrado y la inflamación, y sólo los dos primeros fueron positivos en cuanto a la disminución del sondeo. Así pues, el neem demostró ser igual de efectivo que los tratamientos mecánicos y farmacológicos convencionales, con la ventaja de ser un producto natural, prácticamente inocuo, de bajo costo y buena aceptación.

En Venezuela, Sosa I., Alarcón M., Araujo L., Lucena M, Corao G., Gualtieri M., y Cova J, (2005) llevaron a cabo una investigación titulada *Estudio de la toxicidad del extracto del fruto de la Azadirachta indica en células mononucleares humanas de sangre periférica*. Laboratorio de Investigaciones en Bioquímica. Laboratorio de Investigación de Medicamentos Orgánicos "Dr. Ramón Masini Osuna". Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. [Documento en línea] Disponible: <http://www.asovac.org.ve/ca/sesion/166.html> [Consulta: 2006, Enero 26], cuyo propósito fue "investigar el efecto tóxico del extracto hexanoico del fruto del neem sobre

células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos. Al analizar los resultados se observó para todas las concentraciones en estudio valores por encima de 50 % viabilidad, es decir, baja toxicidad del extracto hexanoico de la planta, garantizando su uso terapéutico en el tratamiento sin riesgo tóxico de diversas enfermedades que afectan al humano”. Este documento fue publicado en el Volumen 56, Suplemento 1, Deposito Legal pp 195002DF456 de Acta Científica Venezolana.

En la Universidad de Carabobo, Montañez, L. (2005) presentó un trabajo titulado *Desarrollo de un Bioinsecticida a partir de la azadirachtina presente en el aceite de Neem (Azadirachta indica)* llevado a cabo en la Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Carabobo. El objetivo general de esta investigación era “desarrollar un bioinsecticida a partir de la azadiractina presente en el aceite de neem”. Se realizó empleando una metodología en la modalidad de proyectos especiales, y fue sustentada en una investigación de campo de tipo experimental y por un estudio documental. El procedimiento se llevó a efecto en función de los objetivos, desarrollándose en las fases: diagnóstico, factibilidad funcional y desarrollo de la propuesta, señala Montanez.

Atendiendo a la necesidad detectada y a la viabilidad puesta de manifiesto a través de los resultados obtenidos, se realizó un bioinsecticida, específicamente repelente en presentación crema, utilizando como agente activo la azadiractina contenida en el aceite de neem, la cual impidió la picadura de los insectos en 99% en la prueba de repelencia inmediata, 86% después de la primera hora y 75% una vez transcurridas dos horas de la aplicación del producto, suministrando dosis de 42 µg de AZA, lo que demuestra su potencial de acción en el control de diferentes plagas, especialmente en mosquitos *Aedes aegypti* adultos, transmisores del dengue, el cual representa un problema de salud pública, de importancia histórica en Venezuela.

Por su parte, Arias, D. y col. (2005), realizaron un estudio denominado *Determinación del Azadirachtina de los aceites esenciales del Arbol de Neem (Azadirachta indica)*, en el Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. En este trabajo, se realizó la extracción del aceite de las semillas, hojas y corteza del árbol neem, por medio de distintos métodos; adicionalmente se extrae aceite vegetal de las semillas por prensado al frío. Se caracteriza el azadiractina presente en los aceites por la técnica de HPLC, con un estándar como patrón de comparación. La extracción con solventes muestra los mejores rendimientos tanto para el aceite obtenido (8,3% en las semillas), como de la cantidad de azadiractina (2434,46 ppm en las hojas). Para el aceite del prensado al frío se determinaron 305 ppm de azadiractina por cada 100g de semillas.

Bases teóricas

Seguidamente, se presenta el apoyo teórico de éste trabajo de investigación, el cual abarca el desarrollo conceptual de las variables establecidas, así como el desarrollo de los hallazgos obtenidos concernientes a la investigación en curso.

- **Evolución de los trastornos periodontales**

La encía: es el tejido queratinizado que recubre el hueso alveolar y la región cervical de los dientes. Se divide topográficamente en tres partes: Papilar, Marginal e Insertada.

La encía insertada impide que los movimientos de los tejidos blandos se manifiesten en el margen gingival y sus fibras colágenas según Kramer son mejores obstáculos a la infiltración de elementos inflamatorios comparados con las fibras de la mucosa alveolar. Algunos autores coinciden en que la presencia de una cantidad suficiente de encía

adherida junto a un tejido conectivo densamente organizado es fundamental para conservar la integridad biomorfológica del periodonto.

A su vez, el hueso alveolar forma y sostiene los alvéolos dentarios y mantiene la encía a un nivel más coronal de lo que sería posible en su ausencia. Está compuesto por la pared interna del alvéolo (lámina cribiforme) formada por hueso compacto y hueso de sostén, constituido por trabéculas esponjosas y tablas vestibulares y palatinas también compactas.

En la región anterior de ambos maxilares el hueso de soporte es muy delgado, es por ello que en esta zona son muy comunes los defectos de la pared alveolar externa. La presencia de encía insuficiente y de una cortical ósea delgada son consideradas condiciones anatómicas favorables para el desarrollo de la recesión periodontal, lo que indica que constituyen factores de riesgo que predisponen su inicio y progreso.

La recesión periodontal es una alteración que se caracteriza por la exposición más o menos grave de la raíz del diente y la disminución de su aparato de soporte. Se observa sobre todo en pacientes con periodonto delgado y raramente en aquellos con periodonto grueso. Diversas investigaciones revelan que no es muy frecuente en la población juvenil. Estudios han demostrado que la recesión periodontal aumenta con la edad y se inicia poco después que los dientes permanentes brotan, progresando gradualmente hasta convertirse en un problema más serio en el adulto, lo que sugiere mantener un estricto control de los tejidos en la niñez con vistas a evitar, limitar o tratar sus efectos.

La acumulación de placa dentobacteriana sobre la superficie dental constituye otro factor de riesgo en el origen y evolución de las afecciones. Esta entidad morbosa presenta gran actividad bioquímica y metabólica, al envejecer cambia su contenido microbiano hacia formas más patógenas, su mineralización continua provoca la formación del cálculo dental, el cual

retiene más placa, al ser duro y rugoso. Investigaciones realizadas, tales como el trabajo de Bracho y colaboradores (2003), han demostrado que existe predisposición a la formación de placa dentobacteriana subgingival en áreas en las cuales los frenillos producían el movimiento del margen gingival debido a su alta inserción, por lo cual este aspecto es considerado un factor de riesgo. Por lo general, la evaluación del frenillo abarca también el estudio de la profundidad vestibular. El frenillo inferior puede volverse importante desde el punto de vista clínico cuando hay recesión de los tejidos marginales o bien una mala posición de los incisivos inferiores que provoca reducción o supresión completa de la encía vestibular; la aparición de varios aspectos predisponentes asociados son denominados factores combinados.

Encía Normal: Se caracteriza clínicamente por su color rosa y consistencia firme; el margen gingival tiene un contorno festoneado. Las papilas dentarias están firmes y no sangran al sondaje y llenan el espacio por debajo de las áreas de contacto. La encía normal libre de acumulaciones significativas de células inflamatorias se denomina encía prístina, y la encía clínicamente sana es similar a la observación pero tiene rasgos histológicos de infiltrado inflamatorio. El infiltrado en la encía clínicamente sana puede llegar a un 5% de volumen y está constituido principalmente por neutrófilos que son atraídos hacia la hendidura por acciones quimiopositivas del huésped (Interleuquina 8, C5A, Leucotrina B4). En esta etapa se inducen a los polimorfonucleares a adherirse a las vénulas y capilares a través de las moléculas de adhesión (ICAM-1 y ELAM-1) y comienzan a migrar a través del vaso quimiotácticamente hacia la hendidura gingival (Moughal y col., 1992. Kinane y col., 1991).

La encía clínicamente sana parece responder a los desafíos microbianos debido al efecto antimicrobiano de los anticuerpos, la función fagocitaria de los neutrófilos, el efecto perjudicial del complemento sobre los microorganismos, la descamación regular de las células epiteliales, la

barrera epitelial intacta y el flujo de líquido positivo de la hendidura gingival que elimina los microorganismos y sus productos nocivos.

Inflamación Gingival: Según Van der Weidjen y colaboradores (1994), ocurre entre los diez y veinte días de acumulación de placa. Aún en esta etapa los signos clínicos son reversibles después de la eliminación de placa bacteriana con medidas de control eficaces (Loe y col., 1965). Las alteraciones clínicas pueden parecer sutiles pero histológicamente se presentan bastantes cambios. El infiltrado celular inflamatorio comprende principalmente linfocitos, macrófagos y neutrófilos y como existe un aumento en la infiltración celular, existe un cambio en la composición de los tejidos.

Las bacterias involucradas son en mayor porcentaje fusobacterias, espiroquetas y bacteroides intermedius. Estas actúan como bacterias oportunistas. Es por ello que se habla de una infección fusoespiroquetal. Al respecto, Carranza (1997) en su literatura señala que, la gingivitis en su fase inicial consta de bacilos grampositivos y cocos gramnegativos; se señala que el paso a la gingivitis es evidente por los cambios inflamatorios registrados en los tejidos gingivales, debido al aumento de la vascularización, y se acompaña primero por la aparición de bacilos gramnegativos y filamentos, más tarde por gérmenes espiroquetales y móviles. Las bacterias identificadas en la gingivitis crónica constan de casi iguales proporciones de especies grampositivas (56%) y gramnegativas (44%), así como microorganismos facultativos (59%) y anaeróbios (41%). Las especies grampositivas son principalmente *S. Sanguis*, *S. Mitis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, y *Peptostreptococcus micros*. Los gérmenes gramnegativos aparecen de modo predominante *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *V. parvula*, y especies *Haemophilus* y *Campylobacter*.

Evolución de la inflamación gingival: Page y Schroeder (1976) clasificaron la progresión de la inflamación gingival y periodontal en función de la evidencia clínica e histopatológica en cuatro fases: inicial,

temprana, establecida y avanzada. Consiguieron que en el hombre era casi imposible obtener estados histológicamente sanos, prístinos o sin infiltrado.

Lesión gingival inicial: histopatológicamente es evidente la dilatación de arteriolas, capilares y vénulas. La presión hidrostática dentro de la microcirculación crece y se forman brechas intercelulares entre las células endoteliales capilares adyacentes. El resultado es un incremento de la permeabilidad del lecho microvascular, de modo que se exudan líquidos, células de defensa (leucocitos) y proteínas (anticuerpos) hacia los tejidos. Los leucocitos migran por un gradiente quimiotáctico hacia el surco gingival.

Lesión gingival temprana: se produce aproximadamente siete días después de acumulación de placa. Los vasos por debajo del epitelio de unión permanecen dilatados, pero su cantidad aumenta debido a la apertura de lechos capilares previamente inactivos. Linfocitos y neutrófilos constituyen la infiltración leucocitaria predominante en esta etapa y se observan muy pocos plasmocitos en la lesión (Listgarten y Ellegaard, 1973, Payne y cols., 1975; Seymour y cols, 1983, Brecx y cols., 1987). El infiltrado celular inflamatorio, en esta etapa, puede responder hasta del 15% del volumen del tejido conectivo. Dentro de la lesión, los fibroblastos degeneran; probablemente se produce esto por apoptosis y sirve para eliminar los fibroblastos del área, lo cual permite una mayor infiltración leucocitaria (Page y Schroeder, 1976; Takahashi y cols., 1995) y esto permite la entrada de leucocitos y polimorfonucleáres.

Lesión gingival establecida: continúa la exposición a la placa durante más de tres semanas. Hay un incremento del exudado líquido y migración de leucocitos hacia los tejidos y la hendidura gingival. La lesión establecida, como la definieron Page y Schroeder, es dominada por los plasmocitos lo que constituye la principal característica de esta etapa. . La pérdida de colágeno continua en ambas direcciones, lateral y apical, al

expandirse el infiltrado celular inflamatorio. El epitelio dentogingival continúa proliferando y se hace más permeable.

La lesión gingival / periodontal avanzada: es conocida como lesión avanzada. Se produce profundización del epitelio y el nicho ecológico se hace anaeróbico. La lesión avanzada tiene todas las características de la lesión establecida, pero difiere en forma importante en cuanto existe pérdida de hueso alveolar, el daño a las fibras es amplio, el epitelio de unión migra apicalmente desde el límite cementoalveolar y hay amplias manifestaciones de lesión tisular inflamatoria e inmunopatológica.

Estas manifestaciones de lesión que se producen a lo largo de todo el proceso de la enfermedad periodontal son dadas por ciertos mecanismos de daño tisular. Se conoce que la destrucción puede ser directa microbiana o indirecta a través del hospedero. La destrucción directa se debe a la elaboración de diversas sustancias por parte de las bacterias.

Periodontitis: La periodontitis presenta una lesión celular y molecular avanzada, con un daño en la estructura del periodonto, prácticamente irreversible, en su avance involucra regiones anatómicas y crea deformaciones estructurales severas en la unidad dentogingival y en la unidad dentoalveolar.

En cuanto a la etiología de la enfermedad periodontal, La placa microbiana es la causa principal de los diferentes tipos de enfermedad periodontal, esta microbiota bucal es una de las que presenta mayor complejidad en el organismo, se encontraron entre 300 y 400 especies y de estas se han recogido entre 30-40 especies periodontopatogénas. Hay claras diferencias entre los tipos de bacterias que residen en el surco gingival sano vs. las encontradas en las bolsas periodontales. Las bacterias asociadas con salud gingival en individuos sanos son menores, en número la mayoría son streptococos gram positivos y Actinomyces, con cerca del 15% de bacilos gram negativos. La gingivitis está asociada

con el aumento en la carga microbiana y en el porcentaje de organismos gram negativos. En la periodontitis del adulto, hay un aumento en el total de la carga microbiana y una fuerte asociación para la enfermedad causada por *Porphyromona gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacilos actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*.

Enfermedades gingivales inducidas por placa dental: Carranza (2003) en su 9na Edición de *Periodontología clínica*, señala que la gingivitis relacionada con la formación de la placa dental es la forma más frecuente de enfermedad gingival y su epidemiología, etiología y características clínicas se analizan en esta obra y en otras fuentes. La gingivitis se caracterizaba antes por la presencia de signos clínicos de inflamación confinados a la encía y en relación con dientes que no presentan pérdida de inserción. Asimismo se observó que la gingivitis afecta la encía de dientes con periodontitis que perdieron inserción con anterioridad pero que recibieron tratamiento periodontal para estabilizar la pérdida de inserción. En estos casos tratados, la inflamación gingival inducida por placa puede recidivar pero sin manifestaciones de que la pérdida de inserción prosiga. A la luz de estas evidencias se llegó a la conclusión de que la gingivitis inducida por placa puede aparecer en un periodoncio sin pérdida de inserción previa o en uno con pérdida de inserción previa pero estabilizada y que no avanza. Esto implica que la gingivitis puede ser el diagnóstico de tejidos gingivales inflamados en torno a un diente que no sufrió pérdida de inserción con anterioridad o a uno que perdió inserción y hueso (reducción de soporte periodontal) pero que en la actualidad no pierde inserción o hueso aunque se observe inflamación gingival. Para establecer este diagnóstico es necesario contar con registros longitudinales del estado periodontal, incluso de los niveles de inserción clínica.

Gingivitis vinculada sólo a placa dental: La enfermedad gingival inducida por placa es producto de la interacción entre microorganismos que se hallan en la biopelícula de la placa dental y los tejidos y células

inflamatorias del huésped. La interacción placa-huésped puede alterarse por los efectos de factores locales que intervienen en la gingivitis, además de la formación de cálculos retentivos de placa en superficies de coronas y raíces. Estos factores coadyuvan por su capacidad de retener microorganismos de la placa e impedir su eliminación mediante técnicas de remoción de placa iniciadas por el paciente.

Clasificación de Enfermedades gingivales inducidas por placa dental: Según Carranza (2003):

- *Gingivitis relacionada con placa dental solamente*
 - o Sin otros factores locales contribuyentes
 - o Con factores locales contribuyentes
 - Factores anatómicos dentarios
 - Restauraciones dentarias o aparatos
 - Fracturas radiculares
 - Reabsorción radicular cervical y desgarros cementarios
- *Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos:*
 - o Relacionadas con el sistema endocrino
 - Gingivitis de la pubertad
 - Gingivitis del ciclo menstrual
 - Vinculada con el embarazo
 - Gingivitis
 - Granuloma piógeno
 - Gingivitis de la diabetes mellitus
 - o Relacionadas con discrasias sanguíneas
 - Gingivitis de la leucemia
 - Otras
- *Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos*
 - o Enfermedades gingivales inducidas por fármacos
 - Agrandamientos gingivales determinados por fármacos
 - Gingivitis influidas por fármacos

- Gingivitis por anticonceptivos
 - Otras
- *Enfermedades gingivales modificadas por desnutrición*
- Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico
 - Otras

Aspectos microbiológicos de la interacción Microbio-Huésped: En general, las bacterias facultativas o anaerobias gramnegativas parecen representar los microorganismos predominantes causantes de enfermedades. Entre las especies bacterianas predominantes que ocasionan procesos patológicos están: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros* y *Eikenella corrodens*. Carranza (2003) *Periodontología Clínica* Págs. 138-139 Cap. 8.

Microbiología e inmunología de las enfermedades periodontales.
Gingivitis: Carranza expresa en su libro que los hallazgos clínicos frecuentes de la gingivitis son eritema, edema, agrandamiento de los tejidos y hemorragia. Se estudiaron dos formas de gingivitis inducida por placa: una gingivitis de aparición natural y la gingivitis experimental. La gingivitis experimental es un modelo clínico longitudinal muy usado en estudios en seres humanos y animales. En los seres humanos, la gingivitis experimental se induce suspendiendo las medidas de higiene bucal; en los estudios de animales se instituye una dieta blanda, que favorece la acumulación de placa. Los estudios de la gingivitis experimental, proporcionan una demostración clara de que la acumulación de placa invariablemente causa gingivitis y que la gingivitis es reversible con la eliminación de depósitos de placa.

Page y Schoeder (citados por Carranza, 2003) revisaron la afectación de los tejidos en la gingivitis experimental humana y animal en un artículo clásico que escribió tres frases de la gingivitis: inicial, temprana y

establecida. En las fases tempranas, la inflamación vascular en infiltración con neutrófilos y después con linfocitos son las alteraciones histopatológicas fundamentales. El infiltrado linfocitario temprano está dominado por células T, pero con el tiempo llegan a predominar las células B. La lesión establecida se caracteriza por un predominio de células B que se transformaron en células plasmáticas en el tejido conectivo. Los neutrófilos continúan predominando en el epitelio de unión y en el surco gingival, con un marcado aumento del flujo del líquido del surco. Vale la pena hacer notar que la pérdida de colágena en los tejidos afectados ya es evidente en las fases más tempranas de las gingivitis. Se registra a su vez un predominio de células plasmáticas en la lesión establecida. Varios estudios de gingivitis experimental humana no pudieron demostrar el predominio de células plasmáticas; sin embargo, el aumento de las proporciones de células plasmáticas es evidente en las gingivitis que llevan mucho tiempo.

El desarrollo de las gingivitis experimental es paralelo a un espectacular aumento de la cantidad de bacterias presentes en la placa. También se observa un cambio bien definido en la composición de las bacterias de la placa, con aumento de los anaerobios gramnegativos. Los estudios sobre microorganismos presentes en la gingivitis natural indican proporciones relativamente iguales de bacterias facultativas grampositivas y anaerobias gramnegativas, con evidencia de un cambio más pronunciado en comparación con la gingivitis experimental. La respuesta del huésped a las bacterias de la placa es en esencia una respuesta inflamatoria que pasa por los procesos ya descritos. Aunque en la gingivitis no hay pérdida de inserción del tejido conectivo, es evidente, desde el punto de vista histológico, que hay cierta pérdida de sustancia colágena dentro de los tejidos conectivos.

Entre las formas especiales de gingivitis están las relacionadas con cambios hormonales, con medicaciones y con enfermedades sistémicas. En estos casos, hay evidencias de una alteración en el ambiente del

huésped que parece contribuir a un aumento de la susceptibilidad de éste a la gingivitis. Por ejemplo, la respuesta inflamatoria a la placa durante el embarazo parece ser exagerada, con una mayor prevalencia y gravedad de la gingivitis, superior a la esperada según el grado de acumulación de la placa. Se sabe de ciertas alteraciones de la microflora subgingival y la respuesta inmunitaria del huésped a los antígenos bacterianos durante el embarazo. Por ejemplo, los aumentos en la concentración de hormonas parecen correlacionarse con incrementos en las proporciones subgingivales de *P. intermedia*, un microorganismo que puede sustituir la Vitamina K por progesterona o estradiol como un factor esencial de desarrollo bacteriano. Estas alteraciones, así como la mayor susceptibilidad clínica a la gingivitis, se resuelven después del parto.

Mecanismo de daño tisular bacteriano: En este proceso, actúan dos componentes bacterianos, los cuales son exotoxinas y endotoxinas. Existen dos tipos de exotoxinas:

- Epiteliotoxinas que favorecen el avance microbiano.
- Leucotoxinas, como la elaborada por *A. actinomycetemcomitans*. con gran actividad sobre leucocitos polimorfo nucleares, que comprometen los mecanismos defensivos en el surco gingival.
- Por otro lado las endotoxinas poseen una serie de actividades biológicas, consecuencia de acciones directas e indirectas por medio de la inflamación. Las más importantes a nivel periodontal son las siguientes:
 - Produce de forma indirecta neutropenia al activar células que liberan mediadores, los cuales estimulan moléculas de adherencia leucocitaria y endoteliales.
 - Agrega las plaquetas.

- Activa el factor XII (factor de Hageman) del sistema de coagulación, determinando una coagulación intravascular. Su activación es un factor importante en el proceso de la inflamación.
- Activa el complemento por la vía alternativa.
- Origina el fenómeno de Schwartzman localizado consecuencia de dos o más exposiciones a la endotoxina. y que determina necrosis tisular.
- Tiene efecto citotóxico sobre los fibroblastos.
- Inhibe el crecimiento de los fibroblastos.
- Induce la reabsorción ósea, por acción de la colagenasa, y sobre los osteoclastos del hueso alveolar.
- Determina la liberación de pro colagenazas. prostaglandinas (PGE), interleucina, factor de necrosis tumoral y factor de crecimiento transformante, especialmente por los macrófagos.
- Activa de forma policlonal los linfocitos B.
- Ejerce una acción tóxica sobre los macrófagos.
- Tiene capacidad de penetrar a través del epitelio.
- Todas las bacterias gram negativas localizadas en el surco gingival están dotadas de endotoxinas, si bien la acción tóxica de las pertenecientes a los géneros prevotella, porphyromonas y bacteroides es más débil al carecer de heptosa y KDO.

Existen otros compuestos como la mueína, la cual induce distintos tipos de respuestas del hospedero, tales como la activación del complemento por la vía alternativa. La estimulación de la reabsorción ósea. La inducción de los macrófagos para que produzcan PGE y colagenasa.

La cápsula ejerce una acción fundamentalmente antiopsonica, siendo uno de los mecanismos de evasión de la respuesta del hospedero. En la

placa subgingival no adherida al diente, no abundan precisamente las bacterias capsuladas; en este sentido sólo *P. gingivalis* posee un material capsular que podría tener esta acción.

Otro mecanismo de defensa son las fimbrias las cuales no son propiamente elementos estructurales que induzcan directamente el proceso destructivo pero si de una forma indirecta. Efectivamente, gracias a ellas, las bacterias siguen adhiriéndose a células y coagregándose. Prácticamente todas las bacterias periodontopatógenas poseen estos elementos, favoreciéndose, hasta cierto punto, su avance. Flagelos y estructuras relacionadas con la movilidad bacteriana asociada a flagelos, como en *Selenomonas*, *Centipeda periodontii*, *Campilobacter* a estructuras filamentosas, que permiten un cierto desplazamiento como en *Eikenella corrodens* o *Capnocytophaga*, podría también ir ligada al avance tisular bacteriano en los tejidos periodontales.

Existen a su vez, enzimas asociadas con la destrucción celular, entre las cuales se mencionan las siguientes:

- Colagenasas que actúan sobre el colágeno no modificado del tejido conectivo subepitelial, ligamento periodontal y hueso alveolar (*P. gingivalis*, *Actinomyces comitans*).
- Tripsinas que actúan sobre el colágeno alterado (*P. gingivalis*, *T. dentícola*, *B. forsythus* y *Capnocytophaga*).
- Estimuladoras de la liberación de procolagenasas por los neutrófilos y fibroblastos.
- Hialuronidasa que favorece la difusión tisular microbiana por el tejido conectivo, por ende, su desorganización al despolimerizar el ácido hialurónico (*P. gingivalis*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*).
- Fosfolipasa A. que actúa como precursor de las prostaglandinas.

- Fosfatasas ácidas y alcalinas que determinan pérdida de hueso alveolar (*P. gingivalis*, *P. Assacharolytica*).
- Condroitinsulfatasa, que atacan al condroitin sulfato B, presente en el tejido conectivo (*P. gingivalis*).
- Otras como gelatinasa, aminopeptidasas, ADNasas, ARNasas, keratinasas y fibrinolisin. producidas por diversas bacterias periodontopatógenas.
- Asociadas con alteración de los mecanismos defensivos del huésped.
- Neuraminidasas que hidrolizan glucoproteínas séricas (*B. Forsythus*).
- Destrucción de inmunoglobulinas y fracciones del complemento.

Es importante resaltar que muchas bacterias periodontopatógenas producen una amplia gama de productos metabólicos finales, que pueden ser tóxicos para los tejidos del huésped: indol, sulfhídrico, amoniaco, aminos como cadaverina y putrescina, compuestos volátiles del azufre, ácidos grasos de cadena corta como butírico y propiónico. Estos metabolitos pueden sufrir, o bien inducir citotoxicidad. Sobre los neutrófilos actúa la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* sobre linfocitos y monocitos, productos solubles elaborados por *C. peridontii*. También debe destacarse que las bacterias como *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus* y *Capnocytophaga* poseen factores que inhiben la proliferación de los fibroblastos y, por tanto, la síntesis de colágeno, interfiriendo la reparación tisular. Este material ha sido extraído de: [http://www.odontologiaonline.com/casos/part/JMLT/JMLT03/jmlt03 .html](http://www.odontologiaonline.com/casos/part/JMLT/JMLT03/jmlt03.html).

Procesos de defensa del huésped: Los mecanismos de respuesta del huésped son básicamente defensivos pero pueden ser responsables indirectamente del daño a los tejidos periodontales. Los mecanismos del

proceso de defensa pueden ser específicos e inespecíficos. Los mecanismos inespecíficos son las barreras físicas del huésped como las superficies epiteliales cutáneas y mucosas. Los mecanismos específicos son resultado de la interacción entre el huésped y el agente atacante (respuesta inmunológica del organismo).

La principal actividad enzimática proviene del huésped. Es importante señalar que existe una relación entre las proteinasas y los moduladores de las funciones de las proteinasas (inhibidores). La liberación de proteasas en las encías y el área de la hendidura promueve reacciones inflamatorias y contribuye al daño del tejido conectivo por distintas vías. Por el contrario, los inhibidores de proteasa sirven como moduladores de la función proteasa en el área y dificultan el proceso inflamatorio. Todas las endopeptidasas provenientes del huésped, de las cuales se sabe que se liberan en la hendidura, pueden ser inhibidas por la función combinada de la alfa-2-macroglobulina (α 2-M) y la alfa-1-antitripsina (α 1AT). De hecho, se ha demostrado la inhibición de la colagenasa gingival por la α 2-M y la colagenasa leucocitaria polimorfonuclear (PMN) es además inhibida por la alfa-1-AT. Las colagenasas bacterianas también pueden ser inhibidas por inhibidores de proteinasa humana, pero también hay posibilidades de que potentes proteinasas como la que posee *P. gingivalis* (gingivaína) son capaces de degradar a estos inhibidores.

Fullmer y Gibson (1966), demostraron que tanto las células epiteliales como el tejido conectivo gingival inflamado son capaces de producir colagenasa en cultivos de tejidos. Una de las metaloproteinasa de la matriz que fueron la colagenasa neutrófila y la colagenasa. Tanto la colagenasa fibroblástica como neutrófila tienen la singular capacidad, no compartida por los otros miembros de la familia, de dividir la triple hélice de los colágenos de tipo I, II y III, iniciando así la degradación de la matriz extracelular. Se piensa que la colagenasa de las MMP llega a la hendidura en los PMN que migran (Birkedal-Hansen y cols, 1993).

Las células involucradas en los procesos de defensa del huésped son las siguientes:

- *Leucocitos Polimorfonucleares (PMN)*: Los PMN de la hendidura gingival constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos periodontales. Esto es ilustrado por las deficiencias cualitativas y cuantitativas, como se da en la neutropenia cíclica y en el síndrome Chédiak-Higashi que conducen a una notoria destrucción del tejido periodontal. La elastasa, una proteasa de serina, que es un constituyente granular primario de los PMN que causa degradación tisular y está presente con mayor actividad en sitios de inflamación gingival (Murray y cols. 1995).
- *Macrófagos*: Tienen una función directa importante en la inmunidad celular. Estas células grandes notablemente fagocíticas forman parte del sistema reticuloendolelial depurador. Su actividad fagocítica mejora por receptores de superficie para la porción Fe de la inmunoglobulina G (IgG), que provee mayor contacto de los antígenos con el macrófago luego de la interacción antígeno-anticuerpo, Participan con los linfocitos T al favorecer la respuesta de los linfocitos B ante muchos inmunógenos. Se considera que los macrófagos procesan el antígeno para el linfocito B, En las lesiones inflamatorias, los macrófagos se forman por la diferenciación de monocitos transportados a la lesión por la sangre. Dichas células actúan de modo no específico con los antígenos que les aportan la capacidad para destruir un grupos diversos de bacterias, sin nexo antigénico.
- *Linfocitos*: Incluyen tres tipos de células: 1) linfocitos T, o células T. derivados del timo y con una función en la inmunidad celular: 2) linfocitos B. o células B. derivados del hígado, el bazo y la médula ósea. Precursores de las células plasmáticas que intervienen en la inmunidad humoral, y 3) células asesinas naturales (NK, por sus

siglas en inglés natural killer) y asesina. Se reconoce que las células T están compuestas por varios subconjuntos que modulan la reacción humoral, Estos incluyen células T cooperadoras-inductoras (células TH) (CD4 positivas), que ayudan en la reacción celular de las células B para que se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos y células T supresoras-citotóxicas (células Ts) (CD8 positivas), que estimulan la actividad citotóxica y microbicida de las células inmunitarias. Las células TH liberan IL-2 e IFN-g. en tanto que las células Ts liberan IL-4 e IL-5. Las células T se subdividen aún más en tres subgrupos (T H1 , TH2 ,TH O), que se distinguen por sus perfiles de producción de citocinas. En la periodontitis del adulto las células TH aumentan y las células TS decrecen con el incremento de la inflamación gingival. Las células B se reconocen por su inmunoglobulina de superficie celular, a menudo inmunoglobulina M (IgM) o (IgD). Sin embargo, algunas células B expresan IgG, IgA o E. Estas inmunoglobulinas de superficie sirven como receptores para antígenos. Las células NK se caracterizan por su falta de receptores para células T (TCR. por sus siglas en inglés T-cell receptors) e inmunoglobulina de superficie. La interacción entre antígenos y macrófagos, conocida como procesamiento de antígenos conduce a la activación de las células NK.

- *Citoquinas*: Las citoquinas son proteínas solubles, segregadas por células, que actúan como moléculas mensajeras que transmiten señales a las otras células. Las interleucinas son miembros importantes del grupo de las citoquinas y están involucradas primariamente en la comunicación entre los leucocitos y las otras células implicadas en los procesos inmunitarios e inflamatorios. El control de la liberación y acción de la citoquina es complejo y depende de inhibidores y receptores. Muchas citoquinas son capaces de actuar sobre la célula que las produjo, de manera que

autoestimulan su propia producción y la producción de otras citoquinas.

Raspado y alisado radicular: El raspado permite eliminar la placa y el tártaro de las superficies dentarias supra y subgingivales. No hay algún intento deliberado por eliminar sustancia dental junto con el cálculo. El término tartrectomía se refiere al procedimiento de remoción de los depósitos de cálculo supragingival. El alisado radicular es el proceso a través del cual se quitan el sarro residual enclavado y las porciones de cemento de las raíces para producir una superficie limpia, dura y uniforme. El objetivo primario del raspado y el alisado radicular es restituir la salud gingival al eliminar por completo de la superficie dental los elementos que provocan la inflamación de la encía (placa, cálculo y endotoxinas). El raspado y el alisado radicular no son procedimientos separados. Todos los principios del raspado se aplican por igual al alisado radicular. La diferencia entre el raspado y el alisado radicular es sólo cuestión de grado. La naturaleza de la superficie dental determina el grado al cual es preciso raspar o alisar la zona. En superficies de esmalte, la placa y el tártaro provocan inflamación gingival. A menos que se encuentren acanaladas o picadas, las superficies de esmalte son un tanto lisas y uniformes. Cuando la placa y el cálculo se forman en el esmalte, los depósitos se insertan por lo general exteriormente a la superficie y no se encuentran trabados en las irregularidades. El raspado simple basta para eliminar por completo la placa y el sarro del esmalte, para dejar una superficie tersa y limpia. Las superficies radiculares expuestas a la placa y el cálculo plantean un problema diferente. Los depósitos de tártaro en las superficies radiculares aparecen a menudo enclavados en las irregularidades cementarias. En consecuencia, el raspado simple no basta para eliminarlos, y es preciso quitar una porción del mismo cemento para suprimir dichos depósitos. Asimismo, cuando el cemento se expone a la placa y al medio de la bolsa, sustancias tóxicas, principalmente endotoxinas, contaminan la superficie.

Testimonios recientes sugieren que dichas sustancias tóxicas sólo se fijan de manera superficial a la raíz y no la penetran a profundidad. El retiro de cantidades extensas de dentina y cemento no es indispensable para que las raíces queden libres de toxinas. No obstante, donde el cemento es delgado, la instrumentación puede exponer la dentina. Si bien éste no es el objetivo del tratamiento, puede ser inevitable. Cuando se comprende de forma correcta la justificación del raspado y el alisado radicular, se hace evidente la urgencia de dominar estas habilidades para lograr el éxito final en cualquier serie de tratamiento periodontal.

Todas las formas de instrumentación mecánica resultan en una pérdida de tejidos duros dentales (esmalte o dentina), en mayor o menor grado (Lasho y cols. 1983).

La realización de un raspado radicular está indicada en los siguientes casos:

- Tejidos inflamados.
- En tejidos gingivales sangrantes.
- En tejidos gingivales edematosos.
- En presencia de bolsas periodontales 3 mm.
- En presencia de factores etiológicos locales como placa, cemento afectado y endotoxinas.

El raspado radicular es especialmente efectivo en el tratamiento de tejidos gingivales inflamados y sangrantes. El cálculo, la placa, el cemento afectado y las endotoxinas son eliminadas durante este tratamiento, obteniendo resultados favorables y eliminando la necesidad del tratamiento quirúrgico de la bolsa periodontal. Este tratamiento elimina la microflora de la superficie del cemento. Puede ser utilizado para preparar los tejidos para cirugía.

Estos procedimientos representan limitaciones en algunos casos:

- Bolsas más profundas 5-8 mm.
- Bolsas que involucran dientes multiradiculares, especialmente las cercanas a la furca.
- Perlas de esmalte, concavidades, furcas y dientes en malposición, cuando la anatomía de la encía es muy delgada y delicada (problemas de acceso).
- Zonas remotas de la cavidad bucal.
- En casos en los cuales existe encía fibrosa.
- Cuando las restauraciones invaden el espacio biológico.
- Factores como los músculos y la lengua también pueden limitar el acceso.
- Para resultados óptimos se requiere un correcto entrenamiento.

Entre los instrumentos utilizados para el raspado y alisado radicular se mencionan los siguientes:

- *Tartrectomos*: Tienen una superficie plana y dos bordes cortantes que convergen en una extremidad afilada y puntiaguda. El instrumento posee una forma de arco que hace que la punta sea tan fuerte que no se rompa durante el uso. Se emplea principalmente para eliminar los cálculos supragingivales. Es difícil insertar la hoja bajo la encía sin dañar el tejido gingival circundante debido al diseño del instrumento. La parte activa se inserta debajo de los bordes de sarro, no más de un milímetro bajo la encía. Se usa con un movimiento de tracción. El cuello puede tener varias secciones, dependiendo del número de vueltas que se le incorporen al diseño. Tienen distintos tamaños y formas. Los más usados son el 103-106 cuyas puntas se utilizan para las caras interproximales de los dientes anteriores y las caras vestibulares y

linguales o palatinas de todos los dientes, y el 107-108 el cual se utiliza de acuerdo a su angulación para las caras proximales de los dientes posteriores. Luego de realizada la tartrectomía se procede a eliminar todas las restauraciones defectuosas o modificar el contorno de restauraciones sobreextendidas, los márgenes sobreextendidos se eliminan sustituyendo toda la restauración o corrigiendo el contorno de la restauración actual. El terminado de la restauración se realiza por medio de tiras abrasivas, o puntas de caucho.

- *Curetas universales*: Sus extremos de trabajo están diseñados en pares para poder atender todas las superficies de los dientes con un instrumento de dos extremos o un par cotejado de instrumentos de un solo extremo. En cualquier cuadrante determinado, al abordar el diente desde el aspecto vestibular, un extremo de la cúrela universal se adapta a las superficies mesiales y el otro a las distales. Cuando el abordaje es desde el aspecto lingual en el mismo cuadrante, es preciso voltear ambos extremos de la cureta universal de extremo doble, dado que las hojas son como imágenes de espejo. Ambos extremos de la cureta universal sirven para trabajar con instrumentos los dientes anteriores. No obstante, en la dentición posterior, por el acceso limitado a las superficies distales, es posible usar un solo extremo de trabajo para tratar tanto las superficies mesiales como las distales usando sus dos bordes de corte. Al adaptar la hoja de la cureta universal, lo más posible del borde de corte debe tocar la superficie del diente, excepto en superficies convexas estrechas como los ángulos línea. Si bien todo el borde cortante debe tocar el diente, la presión ha de concentrarse en el tercio inferior de la hoja durante las maniobras de raspado. Sin embargo, en el transcurso de los movimientos de alisado radicular, la presión lateral debe distribuirse uniformemente a lo largo del borde de corte. La ventaja principal de estas curetas

es que están diseñadas para uso general en todas las superficies dentarias, en todas las regiones de la boca. No obstante, las curetas universales poseen adaptabilidad limitada para el tratamiento de las bolsas profundas en las que la migración apical de la inserción expone las furcaciones, las convexidades radiculares y las depresiones del desarrollo. Por tal motivo, muchos estomatólogos prefieren las nuevas modificaciones de las mismas, específicas para zonas determinadas y diseñadas especialmente para el raspado y el alisado radicular subgingivales en pacientes periodontales.

- *Curetas Gracey*: Son un juego de instrumentos específicos para determinadas regiones. Las diseñó el Dr. Clayton H. Gracey, de Michigan, Estados Unidos, a mediados del decenio de los treinta. Cuatro características de su diseño motivan que las curetas Gracey sean peculiares: son específicas para zonas determinadas, sólo se emplea un borde cortante en cada hoja, la hoja se curva en dos planos y aparece "excéntrica". Cada una de estas características influencia directamente la manera en cómo se emplean las curetas Gracey, y es preciso analizarlas por separado.

Se habla de especificidad regional de acuerdo al tipo de cureta que se emplea durante el alisado. Son siete los pares de curetas en el juego. Las curetas Gracey números 1-2 y 3-4 sirven para dientes anteriores. Los números 5-6 pueden utilizarse en los dientes anteriores y los premolares. Las superficies vestibulares y linguales de la dentición posterior se instrumentan con las curetas Gracey núms. 7-8 y 9-10. Las Gracey núms. 11-12 están diseñadas para las superficies mesiales de los dientes posteriores, y los núms. 13-14 se adaptan a las superficies distales de la dentición posterior. Es posible emplear una cureta Gracey en otra zona de la boca diferente de aquélla para la que se diseñó específicamente, si se comprenden y aplican los principios generales relativos a estos instrumentos. Las curetas Gracey no se tienen que reservar de manera

exclusiva para los pacientes periodontales. De hecho, muchos estomatólogos las prefieren para el raspado general debido a su excelente adaptabilidad.

Como la cureta universal, la Gracey posee una hoja con dos bordes de corte. A diferencia de la universal, el diseño del instrumento Gracey es tal que sólo se emplea un solo borde de corte. Para determinar cuál de los dos es el borde cortante correcto por adaptar al diente, se debe sostener la hoja con la cara hacia arriba y paralela al piso. Cuando se observa desde ese ángulo, puede verse que la hoja se curva hacia un lado.

Existen técnicas específicas elaboradas a base de principios ergonómicos que garantizan mayor eficiencia durante el detartraje. El raspado y el alisado radicular subgingivales se logran con curetas universales o para zonas específicas (Gracey) usando el siguiente procedimiento básico. Se sostiene la cureta con una toma de pluma modificada, y se establece un descanso digital estable. El borde cortante correcto se adapta ligeramente al diente, conservando paralelo el vástago inferior con la superficie dental. El vástago inferior se desplaza hacia el diente para que la cara de la hoja quede casi pareja con la superficie del diente. Entonces se inserta la hoja por debajo de la encía y se avanza hacia la base de la bolsa mediante un ligero desplazamiento de exploración. Cuando el borde cortante llega a la base de la bolsa, se establece una angulación de trabajo de entre 45 y 90°, y se aplica lateralmente presión contra la superficie dentaria. El sarro se elimina mediante una serie de movimientos controlados, traslapados, cortos y potentes utilizando sobre todo un desplazamiento muñeca-brazo que elimina el cálculo, la resistencia al paso del borde cortante decrece hasta que sólo perdura una aspereza ligera. Entonces se activan movimientos de alisado radicular más largos y ligeros, con menos presión lateral hasta que la superficie radicular queda completamente uniforme y sólida. Es preciso girar con cuidado el mango del instrumento entre el pulgar y los dedos para que la hoja permanezca adaptada cerca a la superficie dental

a medida que se siguen los ángulos línea, las depresiones de desarrollo y otros cambios en el contorno del diente. Los desplazamientos del raspado y el alisado radicular deben confinarse a la porción del diente donde aparece el cálculo o el cemento alterado. Dicha región se conoce como la zona de instrumentación. Barrer el instrumento sobre la corona donde no se requiere desperdicia tiempo operatorio, quita filo al instrumental y causa pérdida de control.

La cantidad de presión aplicada a la superficie dental depende de la naturaleza del sarro y de si los movimientos son para la eliminación inicial del cálculo o el alisado radicular final. Cuando se sigue aplicando presión lateral considerable luego de eliminar la masa de tártaro y se readapta repetidamente la hoja con desplazamientos cortos, de fractura, el resultado será una superficie radicular áspera por numerosos cortes y muescas. El resultado semeja a la superficie rizada de un lavadero. Si la presión lateral grande continua con movimientos largos y uniformes, el resultado será la eliminación excesiva de estructura radicular, produciéndose una superficie radicular tersa pero "acanalada" o "ranurada". Para evitar estos peligros de la sobreinstrumentación, es preciso hacer una transición deliberada de los desplazamientos cortos y potentes de raspado a otros más largos y ligeros de alisado radicular, tan pronto como se eliminen el cálculo y la aspereza inicial.

Por otro lado, a la hora de la ejecución del detartraje, se cuentan con otros instrumentos no-manuales que ha demostrado efectividad durante el tiempo operatorio, estos son los denominados dispositivos ultrasónicos, cuyas ventajas han sido aprovechadas por el equipo odontológico en la actualidad; estos equipos son poderosos y efectivos para la eliminación del calculo dental, y representan una opción de menor incomodidad para el paciente si es comparado con el método manual, así como son fáciles de adaptar y manejar, además de utilizar irrigación. También existen generaciones de estos dispositivos que permiten el cambio de la punta, de acuerdo al área a tratar, guardando estas puntas en su forma, gran

similitud con los instrumentos manuales, además de esto, estos aparatos confieren mayor comodidad al pacientes, y disminuyen el tiempo operatorio.

Entre las desventajas que se citan en el uso de este tipo de dispositivos se encuentra la menor sensibilidad táctil, ya que en algunos casos de debe recurrir al uso del instrumento manual para alcanzar ciertas áreas afectadas. Además la presencia de irrigación exige un cumplimiento a cabalidad de las normas de bioseguridad por parte del operador y para la protección del paciente. El uso de estos dispositivos esta contraindicado en pacientes con marcapasos. [Disponible en <http://www.odontologia-online.com/estudiantes/trabajos/jmlt/jmlt03.html>]

- **El Neem**

Árbol de Neem: Es denominado también árbol del grano, orgullo de China, Nim, Margosa, árbol santo, Indiar, árbol lilac. Pertenece a la familia de la caoba (Melicae). Su nombre científico es *Azadirachta indica*. El árbol de crecimineto rápido de Neem prospera en climas tropicales calientes. El árbol que alcanza una altura de 12 metros, es cubierto por una corteza gris pálida, debajo de la cual está una madera rojiza. Puede alcanzar una longitud de hasta 50 centímetros y formar un follaje que se separa. Los racimos de las flores púrpuras, que adornan el árbol a partir de febrero a abril, exudan un olor similar al lila. Éstos se convierten en las frutas , de de color amarillo con núcleos arbolados.

El neem es nativo del subcontinente indo-pakistano. Pradhan y Jotwani, (1968), señalan que en la India puede haber un total de 25 millones de árboles, los que se localizan en un largo cinturón que se extiende hacia el sur desde Delhi y Lahore, hasta Cabo Camorin. En el sur de Asia se encuentra en Bangladesh, Birmania y las partes secas del Sri Lanka. En el sureste de Asia se encuentra de manera dispersa en Tailandia, sur de Malasia, y en las islas de Indonesia al Este de Java. En

Filipinas se introdujo en un programa que cubre 40 000 hectáreas de bosque. También se encuentra en las planicies del norte de Yemen y se introdujo a Arabia Saudita. En África está muy distribuido en Nigeria y Sudán; también se encuentra en la costa del este, desde Etiopía, pasando por Somalia, Kenya, Tanzania y Mozambique, además en el oeste de África está en Mauritania, Togo, Costa de Marfil y Camerún (Ahmed y Grainge, 1986; Leos y Salazar, 1992).

En cuanto a su descripción taxonómica, el neem, es un árbol de hoja perenne, robusto, siempre verde, de rápido crecimiento, corteza gruesa y copa redonda, que alcanza una altura de 30 metros en su etapa adulta, con un diámetro de copa de hasta 10 metros. Logra su máxima producción de frutos a los 10 años y llegan a vivir mas de 100.

- Reino: Vegetal
- División: Embriofitas
- Subdivisión: Angiospermas
- Clase: Dicotiledóneas
- Orden: Geraniales
- Familia: Meliaceae
- Género: Azadirachta
- Especie: Azadirachta indica
- Sinonimia *Melia indica* Juss, *Melia azadirachta* L.

Botánicamente se describe como de corteza gris, o gris oscura, áspera, café rojiza en su interior, de hojas compuestas imparipinadas alternas de 20 a 38 centímetros de largo, y provistas de 8 a 19 folíolos alternados u opuestos, ovalo-lanceolados, oblicuos o subfalciformes, falciforme-lanceolados, brillan-tes; las flores son blancas o amarillo-pálido,

pequeñas, olorosas, numerosas en largas panículas axilares, hermafroditas; el fruto es una drupa pequeña, indehiscente en forma de nuececilla, verdes, amarillas cuando maduran, aromático, oblongo o ovoide-oblongo, de 1.3 a 1.8 centímetros de largo, con una sola semilla exalbuminosa, presentándose la maduración de los frutos de abril a agosto, dependiendo de la ubicación geográfica (Bailey, 1977; Ahmed y Grainge, 1986; Radwanski y Wickens, 1981). En el Campo Experimental Todos Santos de Baja California Sur, México, la maduración se presenta de octubre a diciembre (Osuna, 2000), mientras que en el Valle del Yaqui, Sonora, esto ocurre de septiembre a noviembre.

El neem, nim, margoza o cinamomo, ha demostrado tener propiedades insecticidas y farmacológicas, y ser de beneficio para la agricultura y el desarrollo rural (Saxena y col., 1987). Por otra parte, puede ser utilizado de manera efectiva, en comunidades de bajo nivel tecnológico, para reducir la dependencia de los plaguicidas sintéticos y para generar ingresos. Este árbol, es de fácil propagación, es perenne, ocupa poco espacio, y requiere de poco trabajo, agua, y fertilizantes; no se destruye al utilizar obtener material diverso de su planta; no es maleza ni hospedero de plagas, en cambio, es ornamental y maderable; el material insecticida se extrae con relativa facilidad; los extractos son fáciles de procesar y formular; y proporciona seguridad a los humanos y animales al usarlo y consumirlo en las diferentes formas y propósitos (Ahmed *et al.*, 1984). Disponible en http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/neem_canola.htm

En cuanto a los componentes del neem, las semillas y la corteza, son las piezas principales utilizadas de forma más común, y contienen diversos componentes, así como cada parte de la planta resulta ser útil con respecto a sus propiedades. En relación a esto, la Neem Foundation (1997), publicó un reportaje en el cual exponen las propiedades del Neem. Aquí se señala que, desde tiempos remotos el Neem ha estado asociado con la curación de las enfermedades en el Subcontinente Indio.

Un gran número de medicamentos, cosméticos y otros artículos de belleza y farmacéuticos basan sus fórmulas en los derivados del Neem debido a sus propiedades únicas. De acuerdo a las porciones de la planta, podemos distribuir las propiedades de la siguiente forma:

Corteza: La corteza es refrescante, amarga, astringente y acre. Es usada para combatir el cansancio, tos, fiebre, pérdida de apetito y parásitos intestinales. Es cicatrizante y también se usa en vómitos, problemas de la piel y la sed excesiva.

Hojas: De acuerdo con Ayurveda, las hojas del Neem son una gran ayuda en el tratamiento de dolores neuromusculares. Los reportes que tenemos sobre las hojas del Neem nos indican que son capaces de eliminar las toxinas, purificar sangre y prevenir el daño causado por los radicales libres en el cuerpo, neutralizándolos. También sabemos que las hojas del Neem son una gran ayuda en problemas oculares y de picaduras venenosas de insectos.

Frutas: Las frutas de Neem son amargas, purgantes, anti- hemorroides y anti- inflamatorias por naturaleza.

Flores: Las flores de Neem son usadas en condiciones desequilibradas del Pitta (el equilibrio corporal del cuerpo) y Kapha (tos). Son astringentes, anti-inflamatorias y no tóxicas.

Semillas: Las semillas de Neem son conocidas por sus capacidades anti-inflamatorias, anti-lepróticas, anti-venenos y amargas en sabor.

Aceite: El aceite obtenido de la molienda en frío de las semillas de Neem, es una gran ayuda en los problemas de la piel, un poderoso anti-inflamatorio y de sabor amargo. Tiene un gran espectro de acción y altamente medicinal por naturaleza.

Mezcla: 5 partes del árbol de Neem, La corteza, la raíz, la fruta, las flores y las hojas se usan para las enfermedades de la sangre. También se puede utilizar en problemas de fiebres, salpullidos, heridas, sensación de ardor en el cuerpo y enfermedades de la piel.

Las propiedades antisépticas del Neem son ampliamente reconocidas ahora. Preparaciones a base de Neem son eficaces en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades de la piel, llagas y quemaduras con infecciones. Las hojas, ya sea aplicadas en forma de emplastos o fomentos también se recomiendan para llagas, úlceras y eczema. El aceite de Neem también se puede usar para enfermedades de la piel como escrófula, úlceras y tiña. [Disponible en <http://arboldelneem.tripod.com/id12.html>]

Usos tradicionales del Neem en la India: Gahukar (1995), India señala que existen varios caminos en las costumbres tradicionales de esta zona que santifican e impulsan el uso del Neem. Por ejemplo, las hojas del Neem han sido utilizadas por hombres santos para alejar malos espíritus y enfermedades. Las hojas del Neem se dejan en la boca de los dolientes cuando regresan de un funeral significando dolor. Una mezcla de té hecho de hojas y flores del Neem, melaza y mango maduro, es costumbre beberlo en Año Nuevo para garantizar salud.

En el tiempo cuando los Libros de Los Vedas se escribieron, al Neem se le denominaba Sarva Roga Nivarini (el que puede curar todos los padecimientos y enfermedades) y se le continuó llamándolo así por varios siglos.

Sin embargo, con la llegada de los colonizadores Portugueses, Británicos y Franceses al Subcontinente Indio hace algunos cientos de años, las practicas agrícolas como usar hojas del Neem fueron consideradas regresivas y esto creo un estigma que a su vez provocó que se abandonaran estas prácticas ecológicamente benéficas para usar los

productos químicos importados de Occidente. Los siglos de conocimiento y sabiduría que se habían acumulado en las mentes de las personas, los cuales estuvieron basados en el método de la prueba y el error por generaciones, fueron amenazados con desaparecer lenta y seguramente.

En la India el árbol de Neem se cree para ser el hogar de uno de las creencias indias más viejas: la diosa Sitala, que aparece en mitología como curador de la viruela. Era por lo tanto acostumbrado plantar el árbol al lado de los templos y delante de casas de la vivienda para proteger contra enfermedad. Sus ramas se utilizan para los ritos del Año Nuevo y las curaciones del resorte. Cuando un niño es nato la gente los utiliza para adornar sus chozas y viviendas de modo que la bendigan con ayuda divina. Para compensar la pieza que disgusta a Sitala y ente de quitar sus ofrendas caseras, se coloca el niño delante del árbol para pacificar a la diosa antes de que se retiren las ramas.

El árbol de Neem todavía se planta hoy en avenidas y campos porque refresca el aire y guarda insectos ausentes. Debido a sus diversos efectos numerosos, Neem se refiere a veces en la India como "la farmacia de la aldea".

Aspectos botánicos del Neem: El nombre científico del Neem es *Azadirachta indica*, pertenece a la familia Meliaceae.

Ramos Sánchez R. (s.f) elaboró un material denominado *Aceite de Neem, un insecticida ecológico para la agricultura*. En dicho material, el autor señala que el Neem es un árbol de crecimiento rápido, de hoja perenne, que alcanza alturas de hasta 20 m en condiciones óptimas, con un diámetro medio de la copa de 5 a 10 m, destacando su sistema radicular por tener una raíz pivotante muy desarrollada.

Los frutos son drupáceos, oval-oblongos, amarillos purpúreos, de 1cm de diámetro y normalmente contienen una sola semilla. El fruto tiene una

longitud de 2 cm y, cuando madura, el pericarpio aparece amarillo y de textura rugosa.

El rendimiento del árbol puede variar entre 30 y 100 Kg de frutos dependiendo de las lluvias, insolación, el tipo de suelo y el tipo de variedad. En la India de los 18 millones de árboles existentes, se obtienen 3,5 millones de toneladas de semillas de las cuales se puede extraer 700.000 toneladas mientras que sólo se produce 150.000 toneladas cada año.

Condiciones para la propagación y desarrollo: El árbol Neem se propaga naturalmente por semillas; los frutos cuando están maduros caen al suelo pudiendo germinar si las condiciones son adecuadas, siendo su capacidad de germinación muy alta durante las primeras 4 semanas, descendiendo luego rápidamente. Los frutos empiezan a aparecer cuando el árbol alcanza una edad de 3 a 5 años, hasta los 10 años la producción de frutos no es rentable.

El desarrollo más o menos óptimo de este árbol se ve condicionado por los siguientes factores.

- Humedad relativa.
- Tipo de suelo (acidez o basicidad).
- Edad del árbol (para descubrir a que edad el contenido de azadiractina es mayor).
- Color de la hoja.
- Dureza de la hoja.

Hasta el momento los datos obtenidos indican que la variación en el color de la hoja (verde oscuro, verde claro, verde amarillento y amarillo) y el estado de maduración del fruto (maduro arrugado y seco), tienen

alguna influencia en el contenido de azadiractina, señala Ramos Sánchez..

El Neem puede resistir bien la sequía y años extremadamente secos con precipitaciones de 150 mm así como períodos secos de 6 a 9 meses, (Tabla 1), aunque en la India se observó que en años muy secos respondió con caída de hojas.

En cuanto a las temperaturas, por debajo de 10 °C, es muy difícil que se produzca la fructificación, de este modo las heladas lo matan y si estas son leves no lo dejan fructificar.

Distribución: Se encuentran distribuidos por el continente africano, Asia, la parte central y sur del continente americano y Oceanía, la mayor parte de ellos al sudeste de Asia y al sur del Sahara. Actualmente en 78 países existen árboles Neem. En 9 países se utilizan materias activas provenientes de ese árbol. Se calcula que en todo el mundo existen entre 64 y 91 millones de ejemplares.

Componentes químicos del aceite de Neem: El Neem contienen varios miles de componentes químicos, de especial interés son los terpenoides, compuestos por C, H y O; la presencia del oxígeno hace esos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares. Actualmente se conoce de la existencia de unos 100 terpenoides. El más activo es la azadiractina, de la que existen varios tipos que varían desde la azadiractina A a la azadiractina K.

Ramos Sánchez, quien cita los primeros estudios del Dr. Siddiqui en 1942 (Saxena 1996), muestra que más de 100 componentes terpenoides, la mayoría de los tetranotriterpenoides, diterpenoides, titerpenoides, pentanotriterpenoides, hexanotriterpenoides y algunos compuestos no terpenoides han sido aislado de varias partes del árbol.

Los componentes limonoides (triterpenos) son los más importantes por su actividad y su concentración en el árbol. Estos pertenecen a nueve grupos básicos:

- Azadirona: Se encuentra en el aceite que se extrae de las semillas.
- Amorastaitina: Aparece en las hojas frescas del Neem.
- Vepinina: En el aceite de las semillas.
- Vilasinina: En las hojas del Neem.
- Geduninina: Se encuentra en el aceite de las semillas y de la corteza.
- Nimbina: En las hojas y las semillas.
- Nimbolina. También presente en las semillas.
- Salanina: En las hojas y semillas.

Hasta ahora, al menos nueve limonoides del Neem han demostrado una habilidad para impedir el crecimiento en los insectos, afectando a un número de especies que incluyen algunas de las plagas más mortíferas para la agricultura y la salud humana. Son los componentes *azadiractina*, *salannina*, *melantriol*, y *nimbina* los más conocidos y por ahora al menos, parecen ser los más significativos.

Principales materias activas del Neem: La azadiractina está constituida por al menos nueve isómeros estrechamente relacionados. Los tipos A y B de azadiractina son los que se presentan en mayor cuantía. Se piensa que el 83 % de la azadiractina natural es de tipo A y el 16 % es de tipo B. El resto lo constituyen las variaciones de C a K, por lo que al aislar la azadiractina se detectaban 4 isómeros amorfos con actividad biológica similar.

Para muchos autores la mayoría de los efectos antihormonales y antialimentarios del Neem son debido a la azadiractina. Quarters W

(citado por Ramos Sánchez) considera que del 72 al 90 % de la actividad biológica del Neem es debida al contenido en azadiractina.

Es estructuralmente parecido a las ecdisonas (hormonas que se encuentran en los insectos y que controlan el proceso de metamorfosis del insecto desde el estado de larva hasta que llega a ser adulto).

Esta materia activa no mata insectos, al menos no inmediatamente, sino que en lugar de ello, repele y destruye su crecimiento y reproducción. Los últimos 20 años de investigación han mostrado que es uno de los más poderosos reguladores de crecimiento y frenador de la alimentación que se ha probado. Repele y reduce la alimentación de muchas especies de plagas de insectos así como de algunos nemátodos. Algunos autores demostraron una reducción en la síntesis de ecdisona al aplicar el principio activo. Otros autores (Rembold et al., 1984), sugieren que la azadiractina interviene en el sistema neuroendocrino para controlar la síntesis de la hormona ecdisona y juvenil.

La azadiractina aparece por tanto como una materia activa de origen natural que resulta bastante eficaz; de hecho, es tan potente que una simple señal de su presencia previene a algunos insectos de incluso tocar las plantas. No obstante se han mostrado algunas limitaciones sobre todo debido al efecto de los rayos ultravioletas sobre esta sustancia aceleran su degradación. El efecto residual dura unos cinco días, aunque los efectos juvenoides, es decir sobre el crecimiento, pierden su actividad normalmente después de uno o dos días bajo condiciones de campo.

Las temperaturas parecen jugar un papel de forma indirecta: temperaturas más altas incrementan el efecto porque los insectos son más activos bajo estas condiciones, y el efecto anticomida es conseguido más rápidamente que a bajas temperaturas.

Se ha probado efectiva contra más de 175 especies testadas, a dosis de tan solo 10 ppm.

La azadiractina fue probada por primera vez en la Universidad de Keele, por Morgan, el descubridor de tal sustancia. En Kenia, ese mismo año K. Leuschner , trabajando en el Centro de Investigación de café en Upper Kiambu, observó que un trozo de Neem metanólico, controló la chinche del café (*Antestiopsis orbitalis bechuana*) en cuanto a su crecimiento. La mayoría de las ninfas tratadas con el extracto, murieron durante sucesivos estados de crecimiento y las pocas que sobrevivieron hasta forma adulta, tenían alas y tórax malformados.

Se demostró que la azadiractina era eficaz contra el escarabajo de judía mejicano (*Epilachna viriavestis*) y contra el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*). Se observó que casi todas las hembras pararon de poner huevos. Algunas hembras habían sido completamente esterilizadas y el efecto era irreversible.

La azadiractina parece que actúa bloqueando la producción de ecdisona, de esta forma altera el delicado equilibrio hormonal de los insectos, afectando a su metamorfosis. Las malformaciones producidas en cualquiera de los estadios o los daños morfogenéticos en adultos, como alas, aparato bucal mal desarrollado entre otros, provoca que los daños que puedan producir estos insectos se reduzcan ya que su actividad alimenticia se ve afectada, no pueden volar, son estériles, muriendo rápidamente. Estos efectos se producen de forma combinada y con diferente grado de acción, dependiendo de la especie de insecto, de su estado de desarrollo, del proceso de extracción y de la concentración del preparado.

Hay que tener en cuenta el efecto que la radiación solar produce sobre su eficacia, ya que causa una disminución sobre su efecto anticomida, no

obstante se puede evitar si se mezcla el aceite de Neem, con aceite de angélica, ricino y cáñamo.

Por otra parte el efecto secundario anticomida también ha sido explicado como un posible efecto de la azadiractina sobre los ecdiesteroides. No obstante también ha quedado probado que algunos efectos reguladores del crecimiento del azadiractina se entienden por la acción directa de esta sobre la movilidad intestinal en el caso de *Locustidae migratoria*. Esto quizás lleva a interferir en el proceso de la metamorfosis influyendo en las diferentes etapas de esta.

Es la materia más eficaz, de las contenidas en el Neem, capaz de garantizar el control de las plagas y de ser la alternativa a productos sintéticos, ya que el control añadido de los insectos útiles, que no son afectados, posibilita el reducir el número de aplicaciones tal como se ha comprobado en ensayos de diversos cultivos en diferentes países.

Efecto de las condiciones climáticas sobre el aceite de Neem. El efecto residual de los productos basados en el Neem, se ve en general, reducido en pocos días mayormente alrededor de cinco a siete días. En el caso de los efectos sistémicos y después de la aplicación de altas concentraciones, estos permanecen algo más. No obstante esto parece ser suficiente para obtener un buen control de plagas.

Bajo condiciones tropicales y subtropicales de agua permanente, pierden las fuerzas las ninfas y larvas de los insectos, compensándolo con repetidas e intensivas tomas de comida de las plantas huéspedes. En tales casos el efecto anticomida es vencido a las pocas horas.

El efecto regulador del crecimiento de los insectos del Neem, se ve influenciado indirectamente por la temperatura. Bajos condiciones tropicales, con altas temperaturas, la mayoría de los insectos (ninfas y larvas) mueren en pocos días. En climas templados, especialmente en

primavera, lleva más tiempo alcanzar esta meta, sobre todo si baja la temperatura y predomina la lluvia. La lluvia en ocasiones puede lavar o arrastrar el material activo antes de que alcance a los insectos objetivos.

Bajo condiciones de campo, los extractos foliares de azadiractina duran de 4-8 días. Sin embargo, la temperatura, la luz ultravioleta, el pH en partes de plantas tratadas, la caída del agua y otros factores medioambientales ejercen una influencia más o menos negativa en los principios activos.

El Neem es mucho más efectivo en climas cálidos que en zonas frías, donde la actividad de sus principios se ve muy menguada.

La destrucción fotoquímica por parte de los rayos ultravioletas es completa. Se descubrió (Ermel et al. citado por Ramos Sánchez, 1987), que el contenido en azadiractina de sus extractos fue reducido sobre un 65 % después de 14 horas de exposición a las radiaciones ultravioletas. Se encontró además que la descomposición se incrementaba con el calor y la humedad. Otros autores han descubierto que después de 24 horas expuesto a radiaciones ultravioletas, o después de siete días expuesto a la luz, se producía una degradación del 50 %.

Se ha demostrado que después de 200 horas, (aproximadamente 8 días), de continua exposición a las radiaciones ultravioletas, la azadiractina se degrada un 100 %.

Efectos secundarios sobre los enemigos naturales de las plagas y otros organismos útiles: A causa de un efecto relativamente débil de contacto en los insectos y por su especial modo de acción, los insecticidas basados en el Neem, impiden en la mayoría de los casos un daño o solo llevan a cabo un ligero efecto nocivo a los importantes enemigos naturales de las plagas.

No produce efectos tóxicos por contacto, el efecto sobre organismos beneficiosos apenas se aprecia. No obstante cuando la aplicación de azadiractina se incrementa aparecen algunos efectos sobre la fauna auxiliar, debido principalmente a que en estos casos se acumula azadiractina en las plagas que parasitan.

Algunos autores (Alfonso Molera et al., 1993) consideran que en determinadas condiciones puede incluso incrementarse la efectividad de los antagonistas, ya que los extractos a menudo llevan a las larvas a la muerte de forma lenta y gradual con lo que estas se encuentran durante un cierto periodo en un estado débil, en el cuál es más fácilmente ser atacadas por sus enemigos. [Documento en línea] Disponible: <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/Neem/neem01.htm>. [Consulta 2006, Enero 30]

Uso y aplicación del Neem en la salud humana: Se señala que el Neem posee muchas propiedades terapéuticas, sin embargo su acción aún debe ser investigada. En muchas áreas, la efectividad de esta planta ha sido probada, ya que posee numerosas características antimicrobianas y antiinflamatorias, además de su facultad para favorecer el sistema inmunológico. Por ejemplo, los extractos de la hoja de Neem se han demostrado para ser eficaces contra 14 tipos de hongo (candida incluyendo) y de muchas bacterias (entre ellos: el estafilococo áureo y el typhosa tifoideo). También se ha demostrado para prevenir infecciones virales tales como viruela, varicela, hepatitis B y herpes.

La savia del Neem se utiliza a menudo para el cuidado diario de la piel, del pelo, de los clavos, de las gomas y de los dientes. Los extractos de Neem también tienen una amplia gama de aplicaciones terapéuticas debido a su suave acción antiséptica. Por ejemplo, se utilizan en estados de la debilidad y excesivo indicadores nerviosos tales como pérdida del pelo, caspa, piojos principales, infecciones fungicidas de los clavos, periodontitis crónica y el eczema y para los procesos metabólicos

excesivos tales como piel manchada, acné, nailbed la inflamación y heridas.

El extracto de las semillas se utiliza como pesticida natural eco-amistoso, así como también se menciona el uso del Neem en el cuidado y medicación de la piel. El árbol de Neem armoniza el organismo y regula generalmente procesos nerviosos y metabólicos excesivos en la piel y sus órganos asociados. En cuanto al cuidado del pelo, el Neem se valora debido a su acción de la fortificación en el cuero cabelludo.

Los extractos del Neem suelen incluirse en productos de uso cosméticos; algunas cremas del contorno del ojo, acondicionador herbario del pelo, el aceite del pelo de Neem, la loción del cabello de Neem, el aceite del clavo de Neem, en incluso máscaras de pestaña, se encuentran entre los productos en los cuales el aceite de Neem es incluido.

El Neem en problemas digestivos: El sistema digestivo se compone de la boca, esófago, estómago, duodeno, hígado, páncreas, vesícula biliar, intestino delgado e intestino grueso. El desarreglo en las funciones fisiológicas de cualquiera de estos órganos nos lleva a tener desordenes digestivos.

El Neem trabaja de maravilla para tratar problemas como la diarrea, disentería, acidez y estreñimiento. La acción acre, astringente y estomática del Neem ayuda a curar estos problemas.

Diarrea y disentería: Una cucharada de jugo de hojas de Neem con azúcar se puede tomar tres veces al día.

Acidez: El consumir de dos a cinco hojas de Neem por algunos días ayuda en la náusea. Diez gramos de polvo de corteza de Neem hervidos en una taza de agua la cual se debe reducir a una cuarta parte se puede dar por varios días para curar la acidez y reducir la náusea.

Estreñimiento: Dos a tres gramos de polvo de hoja de Neem junto con tres a cuatro gramos de pimienta negra administradas tres veces al día actúa como laxante y emoliente.

El Neem en problemas respiratorios: La nariz, faringe, laringe, traquea, bronquios y pulmones integran el sistema respiratorio. El síntoma más común que encontramos en enfermedades respiratorias como bronquitis, laringitis, faringitis, tuberculosis, pleuritis, etc. es la tos. Un Te hecho con corteza de Neem es efectivo para controlar la tos seca. Un gramo de polvo de hojas de Neem tomado con miel dos veces al día ayuda a reducir la tos.

El Neem en problemas de vías urinarias: El Neem es efectivo en enfermedades como la albuminuria, fosfaturia y la sensación de ardor en la micción. Tres gramos de polvo de hojas de Neem deberán hervirse en cuatro tazas de agua hasta reducirse a dos tazas. Una vez colado este té deberá tomarse dos veces al día si se observan las condiciones mencionadas al principio. En el ardor al orinar, una cucharadita de jugo de hojas de neem tomada tres veces al día nos servirá.

El Neem para la leucoderma: En este problema, manchas blancas en la piel aparecen por todo el cuerpo. También puede presentarse en los labios y párpados.

Diez gotas de aceite de Neem mezcladas en una cucharadita de azúcar tomadas dos veces al día con regularidad curan este problema generalmente.

El Neem para la diabetes: Siendo el Neem amargo, estomático, antifebre, tónico y revitalizador, trabaja maravillas en esta enfermedad. Una cucharadita (5 ml) de jugo de hojas de Neem tomado en la mañana con estómago vacío por tres meses ayudara en la diabetes. Ya sea

masticar hojas de Neem o tomar su polvo diariamente por la mañana también controlará la diabetes.

El Neem para infecciones por hongos: Los reportes nos indican que el Neem es muy efectivo para tratar una serie de hongos que infectan al cuerpo humano tales como el hongo del pie de atleta que infecta el cabello, la piel, y las uñas; La tiña que invade tanto la piel como las uñas del pie; hongos que se desarrollan en el tracto intestinal; El hongo que causa las infecciones de los bronquios, pulmones y membranas mucosas, además de otro hongo que es parte normal de la flora mucosa el cual puede salirse de control llevándonos a lesiones en la boca, vagina, piel, manos y pulmones.

El Neem para enfermedades virales: Tradicionalmente en la India el Neem se ha usado para tratar algunas enfermedades virales. Existe un buen número de doctores que creen que la viruela, la varicela y las verrugas pueden ser tratadas con una pasta hecha de hojas de Neem, generalmente puesta directamente sobre el área afectada de la piel. Experimentos realizados con la viruela, varicela y sarampión concuerdan que el Neem es sumamente efectivo para prevenirlas sin asegurar la cura. Extractos crudos de Neem absorben los virus efectivamente y previenen que se expandan a células sanas. Pruebas recientes nos demuestran que el Neem es efectivo también contra el virus del herpes y el virus de la hepatitis B.

El Neem para la enfermedad de chagas: La enfermedad de chagas es un problema grave de salud en América Latina. Daña a millones de personas cada año. Pruebas de laboratorio realizadas en Alemania y Brasil nos indican que el neem puede ser una respuesta para esta terrible enfermedad. La enfermedad es causada por un parásito que es acarreado por un insecto llamado chinche besadora. Los extractos de hoja de Neem tienen efecto sobre estos insectos. Estudios nos demuestran que aplicando el Neem a los insectos no solamente los libera de los parásitos,

pero a la vez la azaridactina inhibe a los insectos jóvenes de crecer y a los adultos de reproducirse.

El Neem para la malaria: En el sistema Ayurvédico de medicina el Neem es usado para tratar las fiebres causadas por la malaria. Experimentos recientes nos indican que uno de los componentes del Neem, gedunin, es tan efectivo como la quinina en contra de la malaria. La malaria afecta a millones de personas hasta en las ciudades mas desarrolladas y es responsable por mas de dos millones de muertes al año en la India y en otros países de África y tropicales. China ha adoptado recientemente al Neem para sus operaciones antimalarias. Una fórmula basada en el Neem viz.'Quinahausu' cura la malaria con mucha efectividad. El aceite de Neem, para tratar miles de mosquitos y unas tabletas repelentes de mosquitos se están haciendo muy populares en este tiempo. Debido al creciente problema de la resistencia de los insectos a tratamientos convencionales, cada vez se hace mas difícil el controlar la malaria. El uso del Neem en contra de la malaria es una gran esperanza para erradicarla completamente.

Investigaciones pioneras. Propiedad plaguicida del Neem: El instituto de Ciencias de Banglore (1920), realizó una série de investigaciones sobre el Neem en la India. Ellos promovieron el uso comercial del aceite y torta (residuo de la molienda), lo cual consistió en un trabajo innovador realizado por el instituto anteriormente mencionado. Hasta 1933, la Torta de Neem fue usada en los campos de caña como fertilizante, manteniendo a las termitas alejadas. En este momento, aparecieron los pesticidas sintéticos en el mercado y ensombrecieron el trabajo reciente de la ciencia autóctona.

En 1995, la compañía americana W.R. Grace, reveló químicos agrícolas de un insecticida basado en Neem, una patente en el árbol de Neem el cual fue retirado posteriormente por la oficina de patentes europea el 10 de mayo de 2000. Más que mitad de millón de indios

habían llevado las calles en Bangalore a la protesta contra la patente y la tentativa de quitarles sus derechos sobre el árbol santo de Neem.

Uso odontológico del Neem: Su uso como dentífrico también es corroborado con las antiguas tradiciones hindúes. Las ramitas de Neem también se utilizan allí como cepillos del diente. Se mastican las ramitas jóvenes hasta que se raen y después se utilizan para cepillar los dientes. Estas ramas contienen ingredientes antisépticos los cuales son requeridos para una higiene dental. La Ayurveda describe al Neem como una hierba que se usa para limpiar los dientes y mantener una buena higiene dental. El Neem en forma de polvo también es usado para cepillarse los dientes y dar masaje a las encías. [Documento en línea] Disponible: www.neemfoundation.org/healthes.htm [Consulta: 2005, Octubre 13].

- **Dentífricos y colutorios**

Componentes: Los dentífricos están compuestos por diferentes sustancias y cada una de ellas tiene una función diferente. Estas sustancias son las siguientes:

- Detergentes
- Abrasivos
- Humectantes o humedificantes
- Aromatizantes y edulcorantes
- Colorantes
- Conservantes y Anticorrosivos del tubo
- Sustancias antiplaca bacteriana y anticálculo
- Sustancias que aumentan la resistencia del esmalte
- Desensibilizantes
- Blanqueadores
- Antiinflamatorios y Epitelizantes
- Enzimas
- Portadores de calcio

- Substancias naturales, vegetales

Detergentes: Son agentes tensioactivos que tienen por objetivo disminuir la tensión superficial, penetrar y solubilizar los depósitos que hay sobre las piezas dentarias y facilitar la dispersión de los agentes activos del dentífrico. Los principales son:

- Lauryl sulfato de sodio, es el más usado, es compatible con el flúor
- N-Lauryl sarcosinato de sodio (Gardol), tiene acción antibacteriana
- Cocomonoglicerido sulfanato de sodio (ácidos grasos de aceite de coco)

Abrasivos: Los abrasivos utilizados con mayor frecuencia son:

- Bicarbonato sódico micronizado
- Carbonato cálcico
- Benzoato sódico
- Fosfato sódico
- Fosfato cálcico (meta y piro)
- Metafosfato de sodio
- Hidróxido de Aluminio y lactato de aluminio
- Alúmina
- Silicatos: Xerogel y aerogel de sílice

Humectantes: Son agentes que evitan el endurecimiento del dentífrico, se usan: Glicerina, sorbitol, xilitol y 1,2 propilenglicol

Aromatizantes y edulcorantes: Son sustancias que dan sabor al dentífrico, son utilizados: menta, mentol, canela, fresa, timol, eucalipto.

Como edulcorantes, o sea para dar sabor dulce se usa: sacarosa, sacarina (Benzosulfamida), xilitol, ciclamatos.

Colorantes: Se usan los colorantes habituales que se usan en alimentos y bebidas.

Conservantes y anticorrosivos del tubo: Se usan: Silicato sódico, Formaldehído, Benzoatos, Diclorofenol, Hidroxibenzoatos.

Sustancias terapéuticas

Sustancias Antiplaca bacteriana: Son agentes que actúan sobre la placa bacteriana, eliminando los microorganismos que la forman, inhibiendo la formación de la matriz de la placa y eliminando la placa formada. Los más usados son:

- Clorhexidina (Digluconato de)
- Triclosán
- Sanguinarina
- Hexetidina
- Citrato de zinc
- Fluoruros: Fluoruro de Estaño
- Aceites esenciales
- Lauryl sulfato de sodio (substancia tensio activa con efecto antiplaca)

La Clorhexidina ha sido el más usado y potente de todos los citados. Se usa a concentraciones de 0,12%, 0,2% y al 0.05%. Es bacteriostático y bactericida. Actúa sobre el estreptococo mutans (caries) y la cándida albicans (Micosis), tiene una sustentividad (tiempo de actuación) de 7-12 horas. No se han descrito resistencias, ni alteraciones del equilibrio bacteriano oral.

Como efectos secundarios tenemos:

- Tinciones de los dientes (reversibles y fáciles de eliminar)
- Tinción lingual
- Sabor amargo, sabor metalizado
- Posibles descamaciones de la mucosa bucal.

Las tinciones se acentúan si el paciente bebe vino tinto, café, té y si es fumador.

Los cambios de concentración y los abrasivos que acompañan al dentífrico con clorhexidina hace que las coloraciones o tinciones de los dientes se produzcan con menor frecuencia.

Hoy se usan concentraciones al 0.05% unido a otra sustancia antiplaca que es el cloruro de cetilpiridinio, que al potenciar su acción, permite reducir los efectos secundarios de la clorhexidina.

La combinación de clorhexidina con acetato de zinc hace que se reduzca la posible tinción producida. Los iones de zinc reaccionan con la clorhexidina y se forma sulfato de zinc que es blanco y disimula la tinción. La Clorhexidina se presenta en forma de: dentífrico, colutorio, gel, spray, barniz y chicle.

Se utiliza en el tratamiento de la enfermedad periodontal, como coadyuvante al tratamiento realizado en la clínica dental, en prevención de caries, en las micosis bucales y en cirugía oral. No debe usarse en la enfermedad periodontal si esta no es tratada ya que induce a la acumulación de cálculo.

El triclosan es un derivado fenólico que tiene una acción antiinflamatoria, es un antibacteriano, de sustantividad elevada (actúa 14 horas) y no presenta los efectos secundarios de la clorhexidina. Es un agente que puede ser de uso diario continuado ya que tampoco se han descrito resistencias. Es muy eficaz la unión del triclosán con copolímeros de metoxietileno y ácido maleico o con compuestos de cinc (sulfato o citrato de cinc). Está indicado en pacientes con enfermedad periodontal, debido a su acción antiplaca y antiflogística. Su acción antiplaca es algo menor a la presentada por la clorhexidina.

La sanguinarina es una sustancia vegetal que ha sido poco estudiada. Se ha visto que parece que tiene acción antiplaca y reduce la gingivitis.

La hexetidina es un antiséptico catiónico muy usado, con acción antiplaca que aumenta al unirlo con el cinc.

Con respecto a las Sales de Zinc, se conoce su gran eficacia al ser combinadas con el triclosán o hexetidina. Se citan: citrato de zinc, sulfato de zinc, cloruro de zinc y lactato de zinc. Las sales de zinc tienen un efecto anticálcico, se presume que evitan la calcificación de la placa bacteriana. Otras sales, como el cloruro de cetilpiridinio, el cual es un agente antiplaca.

Los fluoruros tienen efecto antiplaca. El fluoruro de estaño representa mayor eficacia, aunque puede producir tinciones dentarias y alteraciones del gusto.

Los aceites esenciales son los más antiguos de los usados como agentes antiplaca. Su efecto es menor que la clorhexidina y algunos pueden provocar sensación de quemazón. Son combinados a sales de zinc en la actualidad.

Sustancias que aumentan la resistencia del esmalte

Flúor: Los principales compuestos fluorados usados en dentífricos y colutorios son:

- Fluoruro sódico
- Mono flúor fosfato de sodio
- Fluorhidrato de Nicometanol (fluorinol)
- Fluoruro de estaño
- Flúor de aminas
- Fluoruro potásico

Sustancias desensibilizantes: La sensibilidad dentinaria, llamada también hiperestesia dentinaria (dientes sensibles), es el aumento de la

sensibilidad a los cambios térmicos (frío y caliente), a los ácidos (naranjas, limones, vinagres, etc.), a los dulces o por simple efecto mecánico de roce sobre la superficie dentaria. A veces un simple cepillado puede causar una hiperestesia. Existen sustancias para combatir este aumento de la sensibilidad, que por lo general son muy efectivas, pero el tratamiento deberá seguirse de forma prolongada ya que cuando dejan de usar esos productos, suele volver el aumento de la sensibilidad. Las principales sustancias antisensibilidad dentinaria son:

- Nitrato de potasio
- Flúor
- Cloruro de Estroncio
- Cloruro potasio
- Citrato sódico dibásico
- Oxalato férrico
- Lactato de Aluminio

Se pueden combinar los diferentes principios activos para potenciar sus efectos. Así, podemos encontrar combinaciones de nitrato de potasio con fluoruro sódico, con monofluorofosfato de sodio o con fluorhidrato de nicometanol.

Substancias blanqueadoras: En algunos dentífricos, sustancias blanqueadoras son añadidas; entre las más utilizadas se citan: Peróxido de carbamida, Bicarbonato sódico micropulverizado. Otros principios blanqueantes son: Trifosfato pentasódico (Triclene), Citroxaina (pasta Rembrand), Odontoblanxina (Blanx,marca registrada).

Para obtener su máximo rendimiento, estas sustancias deben ser utilizadas después de realizar un tratamiento de blanqueamiento dentario en la clínica dental, por lo tanto son denominados dentífricos de mantenimiento.

Sustancias antiinflamatorias y epitelizantes: Los dentífricos pueden llevar sustancias antiinflamatorias en su composición. Generalmente,

están indicadas en procesos inflamatorios gingivales con lo que se favorece la regeneración o epitelización de la mucosa. Las más usadas son:

- Alantoína
- Aldioxa
- Provitamina B5 (Dexpantenol o Pantenol)
- Vitamina P
- Acido Hialurónico
- Enoxolona
- Vitamina E (aumenta las defensas gingivales)

Enzimas: Hay dentífricos que en su composición asocian enzimas. Los más utilizados son : Glucosa oxidasa, Amiloglucosa oxidasa, Lactoperoxidasa, Glucolactoperoxidasa Estas enzimas actúan sobre el metabolismo de la placa bacteriana y el sistema glucolactoperoxidasa. Actúa en casos de sequedad bucal restableciendo el equilibrio bacteriano alterado en múltiples casos, como puede ser la alteración de cantidad o calidad salival. Este sistema genera un constante flujo de iones hipotiocianato que es básico tenerlos en la saliva.

Substancias portadoras de calcio: Se usa el glicerofosfato cálcico.

Substancias naturales: Existen dentífricos que en su composición llevan sustancias naturales. Hemos visto que hay dentífricos que llevan sanguinarina que es un producto vegetal, pero además se pueden usar otras sustancias vegetales que actúan sobre la cavidad oral, como son:

- Aceite de Castor
- Extracto vegetal de Rheum Palmatum
- Menta piperita
- Salvia
- Mirra
- Manzanilla
- Bedelio

- Esencias de Orégano
- Clavo
- Tomillo
- Berenjena

En la actualidad, existen en el mercado dentífricos que combinan productos naturales, fluoruros y clorhexidina.

Geles: Los geles son más espesos, no hacen espuma y no llevan abrasivos. Se usan en la prevención de caries a nivel profesional (ver prevención de caries).

Existen geles portadores de clorhexidina, los cuales resultan indicados para problemas periodontales, y se usan como coadyuvantes al tratamiento convencional.

A su vez, se encuentran geles portadores de sustancias antisensibilidad dentinaria, como puede ser el fluorinol, nitrato potásico, fluoruro sodico, etc., los cuales actúan durante más tiempo sobre la superficie dentaria para mejorar la sensibilidad con mayor eficacia.

Colutorios: Son líquidos que sirven para realizar enjuagues y tienen prácticamente la misma composición de los dentífricos, aunque no llevan abrasivos. Se diferencian cuatro tipos diferentes de colutorios:

- Colutorios para la prevención de caries (Flúor)
- Colutorios anti placa bacteriana (Colutorios de Clorhexidina, Hexetidina, Triclosán, aceites esenciales, etc).
- Colutorios contra la Halitosis
- Colutorios cosméticos

- **Métodos de Análisis y procesamiento químico**

Cromatografía: La cromatografía es una técnica de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de

primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmobilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución (proceso en el cual, se separan los solutos a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil) a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación. De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene el mayor campo de aplicabilidad y por ello, ocupa una posición dominante (Rouessac y Rouessac, 2003).

La cromatografía es un proceso físico-químico de separación. Se trata de un proceso de aplicación muy amplia, tanto es así que muchas mezclas heterogéneas o en forma sólida pueden transformarse en fase líquida por el empleo de un disolvente. Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva (no confundir con absorción). La cromatografía fue descubierta por el botánico ruso, de origen italiano, Mijaíl Tswett en 1906, pero su uso no se generalizó hasta la década de 1930. Tswett separó los pigmentos de las plantas (clorofila) vertiendo extracto de hojas verdes en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo en el interior de una probeta. A medida que la disolución va filtrándose por la columna, cada componente de la mezcla precipita a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Cada banda corresponde a un pigmento diferente.

La cromatografía en columna utiliza un amplio espectro de adsorbentes sólidos, incluidas la sílice, la alúmina y la sílice gelatinosa. También los líquidos pueden ser adsorbidos en estos sólidos y a su vez sirven como

adsorbentes (un proceso denominado cromatografía de reparto) permitiendo al químico elaborar columnas de diferentes propiedades para diversas aplicaciones. En la cromatografía con líquidos de alto rendimiento, una variante de esta técnica de uso frecuente hoy en día, se utilizan líquidos adsorbidos en partículas muy pequeñas y uniformes, lo cual proporciona una sensibilidad bastante alta. Para llevar la mezcla a través de la columna se precisa una bomba. La cromatografía de capas finas es otra forma de cromatografía en columna en la cual el material adsorbente reposa en un cristal o en una película de plástico.

En la cromatografía en papel, una muestra líquida fluye por una tira vertical de papel adsorbente, sobre la cual se van depositando los componentes en lugares específicos. Otra técnica conocida como cromatografía gas-líquido permite la separación de mezclas de compuestos gaseosos o de sustancias susceptibles de vaporizarse por calor. La mezcla vaporizada es conducida mediante un gas inerte a través de un estrecho tubo en espiral que contiene una sustancia, por la que los componentes fluyen en diferentes proporciones, siendo detectados al final del tubo. Otro método es la cromatografía por infiltración gelatinosa, basado en la acción filtrante de un adsorbente poroso de tamaño uniforme. Con este método se consigue separar y detectar moléculas de mayor masa molecular. El uso de la cromatografía está ampliamente extendido en el análisis de alimentos, medicinas, sangre, productos petrolíferos y de fisión radiactiva.

El esquema de trabajo puede resumirse de la siguiente manera (Rouessac y Rouessac, 2003):

1. Se inmoviliza en una columna un sólido finamente dividido llamado *fase estacionaria*.
2. Se coloca en la parte superior de la columna un pequeño volumen de *muestra* que hay que separar.

3. Se fuerza a la mezcla disuelta, a través de la *fase móvil*, a atravesar la columna de arriba abajo para arrastrar los diversos constituyentes. Si los compuestos de la mezcla migran a velocidades diferentes, podrán recogerse separadamente.

La técnica ha mejorado considerablemente desde sus principios. Actualmente se dispone de cromatógrafos que reúnen alrededor de una columna optimizada y miniaturizada (para poder separar microcantidades de muestras) todo un conjunto de accesorios destinados a asegurar la repetibilidad de las experiencias sucesivas por el perfecto control de los diferentes parámetros de separación. Para análisis sucesivos de una misma muestra, realizados en condiciones idénticas a diferentes intervalos, los tiempos de retención son reproducibles con variaciones de pocos segundos (Rouessac y Rouessac, 2003).

Para revelar la presencia de las sustancias eludidas a la salida de la columna estratigráfica se utilizan *detectores*. El detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

Características de los detectores:

- Sensibilidad. Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- Linealidad. Rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria.

El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:

1. El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección.
2. El límite Superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad.
 - Rango Dinámico Lineal. Rango sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.
 - Ruido. Es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.
 - Límite de Detección. Está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble del nivel de ruido.
 - Corriente de Fondo. Señal constante de salida generada por el proceso en el que un detector está operativo sin que alguna sustancia pasa a través de él. Esta señal es muy importante, ya que permite diagnosticar el buen o mal funcionamiento del detector.

La separación efectuada se conserva en un registro individual llamado cromatograma. Un cromatograma es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. Este gráfico se obtiene gracias a un detector situado a la salida de la columna (Rouessac y Rouessac, 2003).

Tipos de separación cromatográfica. Cromatografía en columna:

En este método un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión (Rouessac y Rouessac, 2003). Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse según la

naturaleza física de las fases, según el *procedimiento utilizado*, según el *fenómeno físico-químico* originario del coeficiente de distribución K. La clasificación seguida a continuación da prioridad a la naturaleza de las fases presentes (Rouessac y Rouessac, 2003):

Cromatografía líquida (LC): La fase móvil es un líquido. Es el tipo de cromatografía que engloba la forma más antigua conocida como método preparativo de separación.

Cromatografía líquida de Alta resolución. Fundamentos y principios básicos: La HPLC es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria (Bermejo, F. 1991). Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, D. 2001). Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso (Skoog, D. A. Et al. 2001). Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. Es la técnica más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución, conociéndose como tal al desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

Instrumentación para la HPLC: Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- Sistema de inyección de muestras
- Columna cromatográfica
- Termostatos para las columnas
- Detectores

- Sistema para el tratamiento de datos y registrador

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable (Hernández L. 2002).

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio.

Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente (Harris, D. 2001).

Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil (Loro J. F. 2001).

Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Según Hernandez, L. (2002), los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 6000 psi.

- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

1. *Bombas recíprocas o de vaivén*, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno (Skoog, D. A. et al. 2001).
2. *Bombas neumáticas o de presión constante*, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas. (Hernández, L. 2002).
3. *Bombas de desplazamiento o tipo jeringa*, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml. (Loro J. F. 2001)
4. Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Existen varios tipos, entre los cuales, el método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* con un diafragma (“septum”) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de

1500 psi. Las *válvulas de inyección* con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado (Harris, D. C. 2001).

5. En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación (Loro J. F. 2001). El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm (Harris, D. 2001). Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible (Harris, D. 2001).

No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. Se pueden clasificar de la forma siguiente: (Hernández, L. 2002)

El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Solventes orgánicos. Etanol: El compuesto químico etanol es un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C. Se mezcla con agua en cualquier proporción y da una mezcla azeotrópica con un contenido de aproximadamente el 96 % de etanol.

Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--OH}$. El etanol es el alcohol que se encuentra en las bebidas alcohólicas.

Datos fisicoquímicos:

- Masa molecular: 46,07 g/mol - 46 u.m.a.
- Punto de ebullición: 78.4 °C
- Punto de fusión: -114.3 °C
- Densidad: 0,789 g/ml
- Densidad óptica: $n_D^{20} = 1,36$
- Acidez (pKa): 15.9 (protón H⁺ del grupo OH)
- CAS-No: 64-17-5
- Concentración máxima permitida en los lugares de trabajo: 1.0000 ppm
- LD₅₀: 7.060 mg/kg rata oral; > 20.000 mg/kg

Síntesis: Desde la antigüedad se obtenía el etanol por fermentación anaeróbica de una disolución con contenido en azúcares con levadura y posterior destilación. En el transcurso de la destilación hay que desechar la primera fracción que contiene principalmente metanol, que se forma en procesos secundarios. Aún hoy, éste es el único método admitido para obtener etanol para el consumo humano. Sin embargo, para fines industriales el método de obtención preferido es por hidratación del etileno ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$)

Para obtener etanol libre de agua se pueden utilizar desecantes como el magnesio que reacciona con el agua formando hidrógeno y óxido de magnesio, aunque es preferible aplicar la destilación azeotrópica en una

mezcla con benceno o ciclohexano. De estas mezclas se destila a temperaturas más bajas el aceotropeo, formado por el disolvente auxiliar con el agua, mientras que el etanol se queda retenido.

Aplicación: Aparte de con fines culinarios, el etanol se utiliza ampliamente en muchos sectores industriales. Es un buen disolvente, puede utilizarse como anticongelante, se emplea como combustible (alcohol de quemar; a este alcohol se le suelen añadir compuestos como la piridina o el metanol, que impiden su uso como alimento, ya que el alcohol para consumo suele llevar impuestos especiales; en algunos países, en vez de etanol se utiliza metanol como alcohol de quemar) en Brasil se añade etanol a la gasolina para bajar la importación de petróleo. Esta última aplicación se extiende también cada vez más en otros países para cumplir con el protocolo de Kyoto. La industria química lo utiliza como compuesto de partida en la síntesis de diversos productos, como el acetato de etilo (un disolvente para pegamentos, pinturas etc.), el éter dietílico, etc. También se aprovechan sus propiedades desinfectantes.

Toxicología: El etanol puede afectar al sistema nervioso central, provocando estados de euforia. Al mismo tiempo, baja los reflejos. Con concentraciones más altas ralentiza los movimientos, impide la coordinación correcta de los miembros, etc. Finalmente, conduce al coma y puede provocar la muerte.

Una elevada parte de los accidentes de tráfico está relacionada con la ingesta de etanol.

La resistencia al alcohol parece aumentar en las personas adultas, mientras que los niños son especialmente vulnerables. Se han comunicado casos de bebés que murieron por intoxicación debida a la inhalación de vapores de etanol tras haberles aplicado trapos impregnados de alcohol.

También es un desinfectante. Su mayor potencial bactericida se obtiene a una concentración de aproximadamente el 70 %.

Análisis: Un método de determinación de la concentración aproximada de etanol en la sangre aprovecha el hecho de que en los pulmones se forma un equilibrio que relaciona esta concentración con la concentración de vapor de etanol en el aire expirado. Este aire se hace pasar por un tubo donde se halla gel de silicio impregnado con una mezcla de dicromato y de ácido sulfúrico. El dicromato, de color rojo anaranjado, oxida el etanol a acetaldehído y es reducido, a su vez, a cromo (III), de color verde. La longitud de la zona que ha cambiado de color indica la cantidad de etanol presente en el aire si se hace pasar un determinado volumen por el tubo.

Las Clorofilas: son una familia de pigmentos que se encuentran en las cianobacterias y en todos aquellos organismos que contienen plastos en sus células, lo que incluye a las plantas y a los diversos grupos de protistas que son llamados algas. La clorofila fue descubierta en 1817 por los químicos franceses Pelletier y Caventou, que consiguieron aislarla de las hojas de las plantas. Pelletier introdujo los métodos, basados en la utilización de disolventes suaves, que permitieron por primera vez aislar no sólo la clorofila, sino sustancias de gran importancia farmacológica como la cafeína, la colchicina o la quinina.

Función: La función de las clorofilas es la absorción de energía luminosa en la variante de la fotosíntesis que llamamos fotosíntesis oxigénica, la que es característica de los organismos antes enumerados.

El principal papel de las clorofilas en la fotosíntesis es la absorción de fotones de luz con la consiguiente excitación de un electrón. Ese electrón excitado cede su energía, volviendo al estado normal, a algún pigmento auxiliar (a veces otras clorofilas), donde se repite el fenómeno. Al final el electrón excitado facilita la reducción de una molécula, quedando así

completada la conversión de una pequeña cantidad de energía luminosa en energía química, una de las funciones esenciales de la fotosíntesis.

Además del papel citado, el de pigmento primario de la antena fotosintética, las clorofilas abundan en los fotosistemas como pigmentos auxiliares, los que se van transfiriendo la energía de excitación.

Estructura química: La estructura de la molécula de clorofila tiene dos partes: un anillo de porfirina sustituida (con pequeños grupos enlazados, sustituyentes) y una cadena larga llamada fitol. El anillo de porfirina es un tetrapirrol, con cuatro anillos pentagonales de pirrol enlazados para formar un anillo mayor que es la porfirina. La hemoglobina de la sangre y otras proteínas contienen también una porfirina, que en ese otro caso constituye lo principal de un grupo hemo; y también se encuentra porfirina en la estructura de la vitamina B₁₂. El grupo hemo contiene un átomo de hierro (Fe); la porfirina de la clorofila lleva en lugar equivalente un átomo de magnesio (Mg). La absorción de determinados picos del espectro de radiación es una propiedad de aquellas moléculas orgánicas que contienen dobles enlaces conjugados (dobles enlaces alternando con enlaces simples); puede verse en las fórmulas desarrolladas contiguas que el anillo porfirínico es rico en tales enlaces.

El fitilo (o resto de fitol; llamamos resto o residuo a la parte de una molécula incorporada a la estructura de otra mayor) es una cadena hidrocarbonada con restos de metilo (-CH₃) a lo largo. Tiene, como todas las cadenas orgánicas basadas sólo en C e H, un carácter "hidrófobo"; es decir, que repele al agua. La cadena del fitilo sirve para anclar la molécula de clorofila en la estructura anfipática de los complejos moleculares en que residen las clorofilas. Absorbancia de las clorofilas a y b a distintas longitudes de onda. Puede verse que absorben los colores de los extremos del arco iris (hacia el azul y el rojo), pero no el verde, de lo que procede su color.

Las clorofilas tienen típicamente dos picos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm de longitud de onda), y otro en la zona roja del espectro (600-700 nm); sin embargo reflejan la parte media del espectro, la más nutrida y correspondiente al color verde (500-600 nm). Esta es la razón por la que las clorofilas tienen color verde y se lo confieren a los organismos, o a aquellos tejidos, que tienen cloroplastos activos en sus células, así como a los paisajes que forman.

Fuera de las plantas verdes, que son de este color, las clorofilas van acompañadas de grandes cantidades de pigmentos auxiliares, principalmente carotenoides y ficobilinas, que son de distinto color y dominan el conjunto, tiñendo al organismo de colores como el amarillo dorado típico de los cromófitos, o el rojo púrpura de las algas rojas.

Determinación de los niveles de clorofila: La cromatografía líquida de alta eficiencia permite la separación de pigmentos que pueden interferir con la determinación espectral. Por esta razón los métodos ópticos pueden sub o sobre estimar las concentraciones de clorofila a, en parte porque los picos de absorción y las bandas de fluorescencia co-ocurren con pigmentos accesorios y con productos de degradación de la clorofila. Este es el caso de feofobides y feofitinas, dos productos comunes de la clorofila a pueden interferir con su determinación (absorben luz y fluorescencia en la misma región del espectro que la clorofila a)

Al permitir la separación de diversos compuestos, el HPLC es un método muy usado para cuantificar con mayor precisión y exactitud los pigmentos fotosintéticos, incluyendo la clorofila a, pigmentos accesorios y productos de degradación de la clorofila a.

Se considera que tanto las clorofilas a y b se detectan a diferentes longitudes de onda; 430 nm para la Clorofila a y 460 nm para la Clorofila b.

Uno de los procedimientos para extracción de clorofila utilizado para su obtención en fitoplancton, se menciona el acetona acuosa como solvente de elección.

Este procedimiento debe realizarse con las luces apagadas para evitar procesos de degradación y deben utilizarse tubos opacos o protegidos de la luz con papel aluminio.

- La recolección de la muestra se realiza en recipiente opaco. Analizar la muestra lo más pronto posible. De lo contrario almacenar la muestra refrigerada a 4°C.
- Agitar la muestra.
- Medir el volumen de muestra (comúnmente 10 mL para altas densidades de células, volúmenes mayores pueden ser necesarios para bajas densidades)
- Armar el dispositivo de filtración utilizando filtros resistentes a la acetona (Whatman GF/F 0.7 μ m o membranas de 0.45 μ m).. En caso de presencia de arena dejar sedimentar 5 minutos y luego trasvasar a otro recipiente cuidando de no pasar arena.
- Filtrar la muestra (Siempre agitar la muestra después de cada vertido dado el gran poder de flotación que poseen las cianobacterias)
- La muestra concentrada en el filtro se puede guardar en papel aluminio en freezer durante 3 semanas siempre que su pH sea mayor o igual a 7.
- Plegar el filtro y colocarlo en un tubo de vidrio cubierto en papel aluminio.
- Con pipeta graduada agregar 3 mL de solución de acetona acuosa y con una varilla de vidrio triturar la muestra.
- Pasar por vortex durante 1 min.
- Ajustar el volumen a 10 mL con acetona acuosa.

- Dejar macerando durante no menos de 2 horas ni más de 24 horas. Agitar al menos una vez durante la maceración para permitir un máximo contacto.

Diversidad y distribución: Las distintas formas de la clorofila se distribuyen desigualmente en la diversidad de los fotosintetizadores oxigénicos. La clorofila a se encuentra en todos los casos, vinculada al centro activo de los complejos moleculares, llamados fotosistemas, que absorben la luz durante la fotosíntesis. La tabla siguiente presenta las diferentes formas de la clorofila y resumen su distribución sistemática. 1. La clorofila b caracteriza a los plastos de las algas verdes y de sus descendientes las plantas terrestres (Reino biología/reino Plantae). Esos plastos, y los organismos que los portan, son de color verde. También se encuentran plastos verdes en algunos grupos de protistas que han asimilado algas verdes unicelulares endosimbiontes adquiriendo así plastos secundarios. Podemos citar a las euglenas, a los cloracariófitos y a algunos dinoflagelados, como *Gymnodinium viride*. También se encuentra en algunas cianobacterias (las cloroxibacterias), que por ello son de color verde planta en vez de azuladas; hace algún tiempo se les atribuyó por este rasgo el carácter de antepasados de los plastos verdes, pero luego se ha comprobado que es un carácter adquirido independientemente en varias líneas separadas.

También se encuentran clorofilas en animales que albergan dentro de sus células o entre ellas algas unicelulares (zooclorelas y zooxantelas). Gracias a esta simbiosis la fotosíntesis contribuye de manera significativa a la nutrición de corales, tridacnas, nudibranchios y otros animales marinos.

No todos los organismos fotosintetizadores tienen clorofilas. Las bacterias que no son cianobacterias tienen pigmentos muy distintos llamados bacterioclorofilas.

Ecología: La clorofila puede detectarse fácilmente gracias a su comportamiento frente a la luz. Medir ópticamente la concentración de clorofila en una muestra de agua da poco trabajo y permite una estimación suficiente de la concentración de fitoplancton (algas microscópicas) e, indirectamente, de la actividad biológica; de esta manera la medición de clorofila es un instrumento importante de vigilancia de los procesos de eutrofización.

La presencia de clorofila es también medida por sistemas de teledetección, que informan sobre la distribución de la producción primaria, incluidas las oscilaciones estacionales y las fluctuaciones interanuales. En esta forma la medición de la clorofila ayuda a la investigación del cambio climático y ecológico a escala global. [Documento en línea] Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Clorofila> [Consulta: 2006, Marzo 15]

Cuantificación de Actividad In Vitro de los Antimicrobianos.

Métodos de dilución: La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el

método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi)automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste.

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocular dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.

Indicaciones y limitaciones: A continuación se detallan los aspectos básicos y metodológicos de los métodos de dilución para su aplicación a microorganismos de crecimiento no exigente (*Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Listeria* spp., enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*). Aun cuando muchos de estos aspectos son aplicables también a los organismos fastidiosos (*Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Streptococcus* spp.), más adelante se revisarán las particularidades propias de estos otros microorganismos (ver el apartado C).

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere

determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada.

La determinación de la actividad antimicrobiana mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2) en vez de una escala continua (como sucede en el método de difusión), por lo que los valores de CMI reales de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Desde el punto de vista clínico la diferencia entre los valores real y experimental de CMI no suelen ser trascendentes cuando se trata de concentraciones bajas, pero pueden tener importancia para las CMIs altas que se acerquen a las concentraciones alcanzables in vivo.

En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros, en particular cuando se utilizan paneles comerciales de microdilución.

Preparación del antimicrobiano: Los antimicrobianos a usar en las técnicas de dilución pueden obtenerse de los correspondientes fabricantes, o comprarse directamente a ciertas compañías comerciales. Para los estudios in vitro no es adecuado utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben emplearse sustancias valoradas de las que se conozcan la potencia (mg de sustancia pura por cada mg de sustancia valorada), la fecha de caducidad y el lote de preparación. Las sustancias valoradas deben conservarse siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor, por lo general en un desecador que se mantiene en frigorífico o en congelador. En el caso de usar desecadores para la conservación, hay que evitar la formación de agua de condensación por lo que, tras

sacarlos del frigorífico/congelador, se deben abrir sólo cuando hayan alcanzado la temperatura ambiente.

La sustancia valorada debe pesarse en una balanza de precisión. Para conseguir una determinada concentración, lo más sencillo es pesar con un ligero exceso una cantidad de sustancia valorada y, posteriormente, añadir el volumen de diluyente necesario. Como resulta obvio, para calcular una determinada concentración de antimicrobiano hemos de considerar la pureza de la sustancia que se esté empleando (que en la mayoría de casos no es del 100%). Las concentraciones de antimicrobianos deben prepararse al menos 10 veces más concentradas que la concentración más alta que se vaya a evaluar, y en todo caso superiores a 1000 mg/l. En la Tabla 6 se indican los diluyentes y solventes necesarios para la preparación de los antimicrobianos más habituales. No es necesario esterilizar las soluciones de antimicrobianos porque la contaminación de estas soluciones es muy infrecuente.

Las soluciones de antimicrobianos se deben emplear el mismo día de su preparación. Alternativamente, se pueden congelar en alícuotas (usando tubos estériles de vidrio o plástico). La temperatura ideal para la conservación de estas soluciones es de al menos -60°C , y en todo caso nunca superior a los -20°C . Se acepta que a temperaturas de -60°C las soluciones madres de antimicrobianos son estables, con muy contadas excepciones, durante al menos 6 meses. En la Tabla 7 se indica la estabilidad de diluciones de antimicrobianos a otras temperaturas. En las Tablas 8a y 8b se recogen esquemas de preparación de diluciones de antimicrobianos para usar en los métodos de dilución en agar y de dilución en caldo, respectivamente.

El número de antimicrobianos a evaluar dependerá de las directrices de cada laboratorio. Debe recordarse que el antibiograma además de ofrecer información de interés clínico puede también tener interés epidemiológico y para la identificación de microorganismos, por lo que puede

considerarse necesario incluir antimicrobianos que no se utilizan habitualmente en clínica. En la Tabla 9 se recogen los antimicrobianos que sería aconsejable evaluar para diferentes grupos de microorganismos según el grupo MENSURA, y en la Tabla 10 los rangos de dilución aconsejables desde un punto de vista clínico. Algunos laboratorios han de estudiar la actividad de nuevos antimicrobianos o realizar estudios comparativos sobre miembros de grupos/familias estrechamente relacionados, pero en general, y teniendo en cuenta que el número de antimicrobianos (de uso clínico) es enorme, no todos ellos se pueden estudiar de forma rutinaria. En general, se escoge un representante de un grupo y se asume que la actividad de otros antimicrobianos del mismo grupo, con igual mecanismo de acción y frente a los que los mecanismos de resistencia bacteriana son similares, tendrán una actividad igual o muy similar. Por otro lado, aun cuando el laboratorio estudie un amplio grupo de antimicrobianos de forma rutinaria, muchos autores consideran innecesario informar de todos ellos al clínico.

Dilución en agar: En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar, teniendo en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos.

Medio de cultivo del Agar: En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente. El medio se obtiene habitualmente de distribuidores comerciales, que indican las condiciones para su preparación. Una vez

esterilizado debe dejarse enfriar a unos 50°C antes de añadir suplementos (si es necesario) y las soluciones con antimicrobiano. El pH del medio, una vez sólido y con los suplementos que se requieran, ha de estar entre 7.2 y 7.4. El medio con antimicrobiano se vierte cuanto antes (para evitar que el agar se solidifique) en placas de Petri estériles, evitando la formación de burbujas que dificultarían la posterior inoculación de las placas. Para placas circulares de 90 mm de diámetro son necesarios 20 ml de medio con antimicrobiano (habitualmente en la proporción 19 ml de medio por 1 ml de solución de la correspondiente concentración de antimicrobiano).

Posteriormente se dejan solidificar las placas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán en frigorífico en bolsas de plástico. Para trabajos de referencia las placas no se deben almacenar más de cinco días, sin olvidar que algunos antimicrobianos (como ampicilina, meticilina, imipenem, ácido clavulánico,...) son poco estables a 4-8°C y, por ello, las placas que los contienen se deben usar el mismo día de su preparación. Tras sacar las placas del frigorífico, se deben dejar a temperatura ambiente unos 30 minutos antes de proceder a su inoculación, comprobando que no exista agua de condensación en la superficie de las mismas. Las placas húmedas se pueden secar en estufa dejando las tapas entreabiertas. En cualquier caso, la evaluación de los resultados obtenidos con placas almacenadas según las condiciones indicadas sólo debe realizarse cuando los resultados con las cepas de control estén dentro de los márgenes indicados (ver más adelante).

Para cada serie de concentraciones se debe incluir al comienzo y al final de la misma sendas placas de medio sin antimicrobiano que servirán para controlar el crecimiento y la posibilidad de contaminación durante el proceso de inoculación.

Preparación del inóculo: Los replicadores suelen dispensar gotas (de aproximadamente 5 mm de diámetro) con un volumen de 1 a 2 µl. El

inóculo que debe contener cada una de estas gotas debe ser de aproximadamente 10^4 UFC, por lo que la suspensión original a usar con el replicador debe tener 10^7 UFC/ml. Esta suspensión produce una turbidez difícil de medir, por lo que habitualmente se prepara una suspensión de 10^8 CFU/ml que posteriormente se diluye 1:10. En la mayoría de los laboratorios esta turbidez se prepara por comparación visual (o espectrofotométrica) con la que corresponde al estándar 0.5 de la escala de MacFarland (densidad óptica de 0.08-0.10 a 625 nm, equivalente a $1-2 \times 10^8$ CFU/ml para la mayoría de los microorganismos no exigentes). La preparación del estándar 0,5 de la escala de MacFarland se indicó en el apartado B.1.6.

En la preparación del inóculo se pueden seguir los métodos indicados en el apartado B.1.4.1. Una vez preparado, debe usarse antes de 15 minutos. Se pondrá una alícuota de cada uno de los inóculos en los correspondientes pocillos del replicador. Para la inoculación se deben preparar las series de placas de modo que se comience inoculando un control sin antimicrobiano, se continúa inoculando a partir de la placa con menor concentración de antimicrobiano y se finaliza sembrando una nueva placa de control sin antimicrobiano. Cada uno de los inóculos se debe sembrar en aislamiento en una placa sin antimicrobiano para comprobar posteriormente la pureza de los mismos, y si fuera necesario disponer de un cultivo fresco tras la correspondiente incubación. Las placas inoculadas se dejarán a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estén secas. Posteriormente se incuban a 35°C durante 16 a 20 horas y se procede a su lectura. La CMI es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo). Ocasionalmente pueden verse algunas colonias o franco crecimiento en concentraciones superiores a la CMI aparente; en estos casos se debe comprobar la pureza del inóculo para

descartar una contaminación; si esta última se confirma deberá repetirse el estudio.

Dilución en caldo: El NCCLS recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con Ca^{2+} (20-25 mg/l) y Mg^{2+} (10-12.5 mg/l). Esta cantidad de iones divalentes asegura la reproducibilidad de los valores de CMI de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos, al compararlos con los que se obtienen con agar Mueller-Hinton. El ajuste de cationes del caldo Mueller-Hinton se hará en función de la cantidad basal que contenga el mismo, habitualmente proporcionada por los fabricantes del medio. Por cada 1 mg/l de incremento que sea necesario ajustar se añaden, al medio ya estéril y a 4°C, 0.1ml de una solución esterilizada por filtración que contiene 10mg de Mg^{2+} /ml (8.26 gramos de $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada) y 0.1ml de solución estéril de 10 mg de Ca^{2+} /ml (3.68 g de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada). Si el fabricante ofrece ya un medio con las cantidades suficientes de cationes divalentes no es necesario ajuste alguno.

Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo).

Método de macrodilución: En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de

antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo.

Método de microdilución: En el método de microdilución cada una de los pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en "U" representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o bien se pueden comprar a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados.

En muchos laboratorios el empleo de paneles comerciales se basa en la utilización de sistemas semiautomáticos de incubación-lectura-interpretación; esto facilita su uso, pero tiene el inconveniente del incremento del gasto. Algunas compañías han introducido en el mercado paneles en los que el medio de cultivo incluye un indicador fluorescente que permite la obtención rápida (menos de 8 horas) de los resultados; sin embargo, no existen aún datos suficientes que permitan aconsejar el uso rutinario de este tipo de paneles. Varias compañías comerciales están evaluando, también, sistemas expertos (programas informáticos) que facilitan la interpretación clínica de los resultados obtenidos; es presumible que su uso se generalizará en un futuro. No se discutirá el uso de estos sistemas comerciales; se remite al lector a la información proporcionada por los propios fabricantes. En lo sucesivo nos referiremos al método de microdilución preparando las placas en el propio laboratorio.

Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), podemos estudiar con cada una de ellas, y para el mismo

microorganismo 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. En ocasiones se preparan placas con 12 diluciones de antimicrobiano y se utiliza una placa adicional para realizar los controles. El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100 µl, por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100 µl de caldo con antimicrobiano (volumen de inóculo menor de 10 µl) o 50 µl (si se van a usar también 50 µl para inocular la placa). En este último caso debe tenerse en cuenta, a la hora de calcular la concentración inicial más alta, que tras añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad. Dependiendo, pues, del volumen de inóculo final, las placas se rellenan utilizando una pipeta multicanal con 100 ó 200µl de la solución más alta de antimicrobiano en la columna 1. Posteriormente se añade un volumen de 50 o 100µl de caldo sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 2 a 11 y se realiza la dilución en la forma habitual empleando la pipeta multicanal, dejando los pocillos de la última columna como controles (positivos - no antimicrobiano- y negativos - no inóculo-).

Inoculación: Si se van a añadir suplementos a los pocillos de las placas de microtitulación se producirá una dilución del volumen final; en el caso de que el volumen añadido no supere el 10% del volumen total no es necesario tener en cuenta este efecto.

El inóculo en los métodos de dilución en caldo se prepara a partir de suspensiones del 0.5 de la escala de MacFarland, empleando cualquiera de los dos métodos (crecimiento o suspensión directa) indicados anteriormente. El inóculo final será de 5 (se acepta de 3 a 7) x 10⁵ CFU/ml, ó 5 x 10⁴ CFU/pocillo en la técnica de microdilución. En función de ello la suspensión inicial se diluirá en caldo Mueller-Hinton dependiendo del método elegido. En el método de macrodilución se hará una dilución 1:100 de forma que al añadir 1 ml a los tubos con 1 ml de medio con antimicrobiano queden 10⁶ CFU en 2 ml, es decir 5 x10⁵ CFU/ml. De forma análoga, en el caso de la microdilución se hará una

dilución 1:10 (en el caso de emplear un inóculo de 5 µl) o 1:100 (en el caso de emplear un inóculo de 50µl). El inóculo ya diluido debe usarse antes de 15 minutos tras su preparación. Las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Es necesario controlar el inóculo así preparado, sembrando alícuotas diluidas en medio sólido que, una vez incubadas, permitan el recuento del inóculo realmente usado. Una forma sencilla de realizar este recuento es diluir 10 µl del tubo o del pocillo de control positivo en 10 ml de suero salino, sembrando posteriormente 100 µl de esta dilución. Para un inóculo de 5×10^5 CFU/ml deben crecer 50 colonias en la placa de medio sólido.

Los tubos o placas se incubarán a 35°C durante 16 a 20 horas, o en las condiciones necesarias que se detallan posteriormente para casos especiales. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se deben apilar más de cuatro o cinco placas.

Tras la incubación se procede a la lectura de los resultados. La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente (o el 80% en el caso de las sulfamidas) el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación.

Informe de los resultados: Cuando la determinación de la CMI tiene una finalidad clínica, no es aconsejable presentar simplemente los valores absolutos obtenidos con cualquiera de los métodos expuestos. Resulta más útil traducir, mediante una categorización cualitativa, estos valores de CMI. La interpretación de estos resultados debe considerar también aspectos farmacocinéticos, posibles mecanismos de resistencia y datos de eficacia clínica. De esta forma se pueden distinguir tres categorías clínicas: sensible, intermedio y resistente.

En la actualidad existen varios grupos de estudio que han establecido puntos de corte que permiten establecer las tres categorías citadas, pero estos valores varían de unos grupos a otros. En España, el grupo MENSURA ha establecido recientemente los puntos de corte que definen las categorías de sensibilidad y resistencia y se recogen, de forma comparativa, los puntos de corte establecidos por este grupo, NCCLS, CA-SFM (Sociedad Francesa de Microbiología) y BSAC (Sociedad Británica de Quimioterapia).

Dilución en Agar (método de referencia para bacterias anaerobias): Este procedimiento es el de referencia para determinar las CMIs de las bacterias anaerobias. Permite estudiar la sensibilidad de muchas bacterias a la vez. No es rentable para utilizar diariamente. Se utiliza en dos situaciones: 1) para controlar periódicamente los patrones de sensibilidad de los aislados anaerobios de un hospital a los antibióticos en uso, y 2) para conocer los patrones de sensibilidad a los nuevos antimicrobianos.

El método es el mismo que el descrito en el apartado C.3.2.. Brevemente, consiste en realizar varias concentraciones (generalmente al doble) de un antimicrobiano, cada una de ellas se mezcla con agar a 50° C y se vierte en una placa de Petri y se deja solidificar. Con ayuda de un replicador de Steers, las suspensiones estandarizadas, de hasta 36 aislamientos bacterianos diferentes, se pueden inocular en cada placa.

Tras la incubación anaeróbica durante 48 h. de las placas, la concentración mas baja de antimicrobiano, capaz de inhibir el crecimiento de un aislado, es la CMI de ese antimicrobiano para esa bacteria.

Materiales para la Dilución en Agar para bacterias anaerobias:

Medios de cultivo para incorporar los antibióticos:

- Agar Wilkins-Chalgren
- Para las bacterias que no crezcan en el medio anterior, se utilizará Agar Brucella suplementado con vitamina K1 (1µg/ml) y 5% de sangre de carnero lacada. (La sangre se laca congelándola y descongelándola alternativamente).

Medio de cultivo para preparar el inóculo: Caldo tioglicolato sin indicador (BBL 135 C), enriquecido con hemina (5 µg/ml) Vitamina K1 (1µg/ml) y Na H CO₃ (1mg/ml). Para ajustar la turbidez del inóculo: Caldo Brucella.

Aparatos: Son necesarias para la incubación de las pruebas jarras de anaerobiosis o cámara de anaerobiosis.

Control de calidad

- Incluir al menos dos de las cepas control de la colección Americana ATCC siguientes:
- Bacteroides fragilis ATCC 25285
- Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29741
- Eubacterium lentum ATCC 43055
- En placa sin antibiótico: control positivo de crecimiento en anaerobiosis.
- En placa sin antibiótico: control negativo de crecimiento en 5% de CO₂.
- Indicador de anaerobiosis.

- Control de recuento de inóculo. Los valores de las CMI obtenidas a los diferentes antimicrobianos para las cepas control aparecen en la tabla 12.

Método: La preparación de las placas con antimicrobiano se realiza de acuerdo con el procedimiento estándar de dilución en agar.

Preparación del inóculo: La bacteria a estudiar se encontrará en un medio no selectivo (ej. agar sangre enriquecido) tras 24 h de incubación en anaerobiosis. Se toma, con un asa de siembra, porciones de unas 5 colonias (si son colonias muy pequeñas, las suficientes para llenar un asa de 3 mm de diámetro). Estas colonias se inoculan en el caldo tioglicolato que se incuba de 6 a 24 h, hasta que se observa turbidez. La turbidez se ajusta con caldo Brucella a una densidad equivalente a la del estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Un procedimiento alternativo para las bacterias que no crecen bien, es preparar la suspensión de las colonias de forma directa, de la placa en caldo Brucella (las colonias no tendrán más de 72 h y no estarán en condiciones anaerobias más de 30 minutos antes de utilizarlas) ajustándola igualmente al 0.5 de MacFarland. La densidad final del inóculo, en ambos casos, será de 1×10^5 en cada gota sobre la placa.

Inoculación de las placas: Cada inóculo bacteriano se transfiere a un pocillo del replicador y las placas se inoculan con la gota que coge cada pincho de la parte superior del replicador (igual que en el procedimiento estándar descrito en el apartado C.3.2.) Inocular 2 placas sin antibiótico al principio y final de cada serie. Una se incuba en anaerobiosis como control positivo de crecimiento. La otra se incuba en atmósfera de CO₂ para detectar contaminación.

Incubación: Una vez inoculadas las placas se pueden dejar 5-10 minutos en aerobiosis hasta que las gotas son absorbidas por el agar (no es necesaria la anaerobiosis durante la replicación) tras esto se invierten

las placas y se colocan en la jarra o en la cámara de anaerobiosis durante 48 h. a 35° C.

Microdilución en caldo para bacterias anaerobias: El aumento en el número de antimicrobianos útiles en el tratamiento de las bacterias anaerobias, y el incremento de las resistencias a los mismos, da como resultado la necesidad de considerar un método que sea útil en los laboratorios clínicos para estudiar la sensibilidad de determinados anaerobios. El método de microdilución es el más práctico en estos momentos y da resultados comparables al método de dilución en agar que se considera el de referencia.

Una microplaca de múltiples pocillos (o placa microtiter) que contienen concentraciones crecientes de varios antimicrobianos, es inoculada con una suspensión en un caldo de la bacteria anaerobia a estudiar. Tras 48 horas de incubación a 35°C en una atmósfera anaerobia, se determina la CMI como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe un crecimiento visible. Los paneles se pueden preparar en el día o tenerlos congelados. Además hay paneles comercializados para anaerobios con los antimicrobianos congelados o liofilizados.

Materiales a utilizar para la microdilución en caldo para bacterias anaerobias: Son los mismos que los indicados en el procedimiento de microdilución en caldo estándar, con las siguientes modificaciones:

Medio de cultivo para la microplaca:

- Caldo Wilkins-Chalgren. Suplementado con Vitamina K1 y hemina. La necesidad, de algunas especies anaerobias, de otros suplementos para crecer en caldo se puede consultar en la obra de Isenberg.

Medio de cultivo para preparar el inóculo:

- Caldo tioglicolato, igual al del método de dilución en agar.

Aparatos:

- Son necesarias para la incubación de las placas jarras de anaerobiosis o cámara de anaerobiosis.

Método: La preparación de las microplacas se realizará por el procedimiento estándar para la microdilución en caldo (apartado C.3.3.). El volumen final de caldo por pocillo será de 100 µl.

Preparación del inóculo: Ver el método anterior de dilución en agar.

Inoculación: Varía de acuerdo al estado del antimicrobiano en las microplacas. Si se encuentra liofilizado, el inóculo va en el caldo utilizado para reconstituirlo a razón de 1×10^6 UFC/ml, echamos 100 µl por pocillo. Si el volumen de caldo en el pocillo es de 90 µl el volumen del inóculo es de 10 µl con una concentración de 10^7 UFC/ml. Siempre lo haremos para tener 10^5 UFC por pocillo.

Incubación: Las microplacas se incubarán a 35° C en la jarra o en la cámara de anaerobiosis durante 48 h.

Resultados: La lectura se hará con luz indirecta o con un espejo. La CMI es la concentración donde se observa un cambio marcado en la turbidez con respecto al control. Material extraído de Publicación en línea de García Rodríguez, J. y col (2000) titulada *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Consulta 2006, Marzo 15]. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap11.htm>

Definición de términos

Acetonitrilo: ($\text{CH}_3 \text{CN}$). Se utiliza ampliamente para solutos tales como compuestos organometálicos o sales que contienen grandes iones alquilamonio, que son insuficientemente solubles en agua. Es estable en un margen amplio de voltajes. Es un buen disolvente para reacciones electroquímicas. posee un margen de voltaje en el que no se oxida o reduce, de modo que sus propias reacciones electrónicas no tienen prioridad sobre aquellas que interesan evaluar. Es por esto que el Acetonitrilo fue el disolvente de elección en el estudio cromatográfico del Aceite esencial.

Azadiractina: Es el componente activo de mayor abundancia en el árbol de Neem, además de ser el más estudiado. Químicamente, está constituida por varios isómeros; se han identificado varios tipos de Azadiractina, desde A hasta K. Estudios han demostrado que la hoja del Neem contiene la mayor cantidad de Azadiractina.

Bactericida: se le llama bactericida a un agente que elimina a los microorganismos capaces de producir infección de manera irreversible.

Cultivo anaeróbico: Es el caldo de cultivo de elección para bacterias anaeróbicas. Contiene sustancias reductoras del potencial de óxido reducción y está contenido en un tubo hermético (tapón de goma o tapa rosca). Según la U.S. Pharmacopea XVI (1960), está compuesto por: Peptona de caseína, Dextrosa, Tioglicolato de sodio, Extracto de levadura, Cloruro de sodio y L-Cistina, presentando un pH final de $7,1 \pm 0,2$. Está elaborado de acuerdo a la fórmula del National Institute of Health y de la USP.

Clorofila: pigmentos que se encuentran en las cianobacterias y en todos aquellos organismos que contienen plastos en sus células, lo que

incluye a las plantas y a los diversos grupos de protistas que son llamados algas.

Compuesto activo: Se define compuesto o principio activo al componente de una planta que presenta una acción curativa o nutritiva sobre el organismo humano.

Cromatografía: Es una técnica de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. En éste estudio, la cromatografía es utilizada para determinar los niveles de Azadiractina en el extracto.

Desodorante: Se refiere a un producto que destruye olores molestos o nocivos. Disponible en: www.rae.es [Consulta 2006, Marzo 16]

Diclorometano: también denominado Dicloruro de Metilo. Es un líquido incoloro, muy volátil, el cual se percibe de 200 a 300 ppm. Es poco soluble en agua, sin embargo, es miscible en la mayoría de los demás solventes orgánicos. Por otro lado, el diclorometano disuelve una gran cantidad de grasas, aceites y resinas. Cuando se encuentra bajo la presencia de agua y luz, el proceso de oxidación por parte del diclorometano se incrementa. Además, el exceso de calor puede causar la emanación de gases, los cuales se exponen al ambiente resultando muy tóxicos. Aunque no se reportan daños importantes a la salud, el diclorometano puede causar dermatitis y problemas respiratorios si el contacto con el disolvente es directo y continuo, por lo tanto, normas de bioseguridad deben ser seguidas para la manipulación de esta sustancia.

Etanol: El compuesto químico etanol es un líquido incoloro e inflamable, el cual, se utiliza ampliamente en muchos sectores industriales debido a su buen poder disolvente, puede utilizarse como anticongelante, se emplea como combustible La industria química lo utiliza como

compuesto de partida en la síntesis de diversos productos; en el presente estudio, se utilizó Etanol para la obtención del extracto de hojas de Neem. También se aprovechan sus propiedades desinfectantes.

Extracto: Según la Real Academia española (2006) se define extracto como un producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales. Los extractos pueden ser: acuosos, alcohólicos, etéreos. En ésta investigación se obtuvo un extracto alcohólico debido a la naturaleza del solvente (Etanol).

Fitoplancton: Parte vegetal del plancton, es decir organismos con escaso o nulo poder de desplazamiento. Lo constituyen algas del océano

Gingivitis asociada a placa: Carranza (2003) lo define como el diagnóstico de tejidos gingivales inflamados en torno a un diente que no ha sufrido pérdida de inserción con anterioridad.

Medicina Natural: Es un concepto de gran amplitud que se refiere a una gran variedad de medicinas complementarias y alternativas, incluyendo: medicina herbaria, suplementos dietéticos, homeopatía, acupuntura, terapia neural, biomagnetismo, digitopuntura, y otras de las muchas medicinas alternativas que existen actualmente.

Neem: El nombre científico del Neem es *Azadirachta indica*, pertenece a la familia Meliaceae. El Neem es un árbol de crecimiento rápido, de hoja perenne, que alcanza alturas de hasta 20 m en condiciones óptimas. La Neem Foundation (1997) hizo un reportaje en donde expresaba que el Neem es utilizado para tratamientos de la piel, analgésico, antiparasitario, trastornos oculares, antiinflamatorio, antimicrobiano, plaguicida, entre otras propiedades.

Placa bacteriana: Es una biopelícula relacionada con el huésped (Carranza, 2003), cuya comunidad se forma en un principio por

interacciones bacterianas con el diente, y luego mediante interacciones físicas y fisiológicas entre especies diferentes en la masa microbiana. Así también, factores ambientales externos que podría mediar el huésped tienen mucha influencia sobre las bacterias presentes en la placa. La ruptura del equilibrio entre las bacterias genera alteraciones en el huésped y la biopelícula bacteriana y por último se destruyen los tejidos conectivos del periodoncio.

Pool bacteriano: Es un cultivo preparado de microorganismos obtenidos de un mismo nicho, cuya funcionalidad y características metabólicas son similares y, por lo general, son más eficientes cuando sus funciones son combinadas.

Rotaevaporador: Denominado también evaporador rotativo. Es un aparato utilizado para la extracción de material biológico mediante un sistema de destilación por arrastre de vapor. En este estudio, se utilizó para separar el extracto de hojas de Neem del solvente orgánico utilizado (Etanol)

Tabla de especificaciones

OBJETIVO	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
1.- Determinar la importancia del estudio del Neem en el tratamiento de la Gingivitis asociada a placa, mediante un estudio diagnóstico de la necesidad	Importancia del estudio del Neem	Se define como el documento o tratado en el que se dan preceptos para encaminar o dirigir en cosas, que describe en forma sistemática y metodológica los objetivos, técnicas y procedimientos de las diferentes herramientas de control, para realizar los estudios, análisis y evaluaciones a las entidades o sujetos de control	Se define como una planta de origen hindú, utilizada en otras culturas con fines terapéuticos, entre ellos la salud bucal. La Neem Foundation (1999) menciona, como propiedades de la planta: Antiinflamatoria, antibacteriana, antimicótica, entre otras...	<ul style="list-style-type: none"> - Existencia de estudios científicos sobre: <ul style="list-style-type: none"> • Aplicación odontológica del Neem • Evaluación de propiedad bactericida - Nivel de especificación y confiabilidad de otros productos odontológicos a base de Neem existentes en el mercado 	<ul style="list-style-type: none"> - Presencia o ausencia - Concentración de compuesto activo - Composición química - Código de Registro - Dosificación

				- Características de otros compuestos activos de productos existentes en el mercado	- Efectividad - Costo - Efectos adversos
--	--	--	--	---	--

OBJETIVO	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
2.- Establecer la factibilidad económica en función del costo/beneficio de la elaboración de un estudio In Vitro	Factibilidad económica	Consiste en la realización de una valoración técnico-económica del objetivo del proyecto al que se debe solución, y las posibles formas de lograrlo	Cálculo de todos aquellos recursos humanos, materiales, técnicos y financieros necesarios para establecer con seguridad el alcance de los objetivos planteados	- Vialidad de la propuesta	- Recursos humanos - Recursos financieros - Recursos materiales

OBJETIVO	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
3.- Evaluar la actividad bactericida del aceite a base de hojas de Neem sobre bacterias bucales en anaerobiosis, a través de un estudio de factibilidad funcional	Factibilidad funcional	Consiste en la realización de una valoración funcional o de utilidad, con respecto al objetivo del proyecto a que se debe solución.	Evaluación del efecto bactericida del Aceite esencial, para fundamentar de forma funcional la realización de un estudio sucesivo bajo las condiciones planteadas en los objetivos de esta investigación.	- Ensayo piloto In Vitro con bacterias bucales en anaerobiosis en contacto con solución de Neem al 2%	- Actividad bactericida - Tiempo de inhibición de crecimiento bacteriano - Efectividad del aceite a bajas concentraciones

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El presente proyecto de investigación es de tipo Proyecto Factible, ya que según Orozco, C., Labrador M., y Palencia de Montañez, A. (2002) constituyen una alternativa de solución viable para una situación planteada, fundamentados en la planificación consultiva desarrollados en medios impresos o virtuales.

Diseño de la investigación

Es un proyecto tecnológico de desarrollo de un aceite esencial puro de hojas de Neem, con la finalidad de evaluar la propiedad antibacteriana del mismo, por medio de un estudio de factibilidad funcional.

Para la obtención de los resultados finales de este estudio, se llevó a cabo una fase experimenta, la cual constó en una serie de procedimientos químicos para la elaboración del Aceite esencial a base de hojas de Neem. Posteriormente, pruebas de análisis fueron realizadas, así como la elaboración del ensayo piloto In Vitro.

Los resultados arrojados obtenidos al final de este estudio, sentarán las bases para que luego de la obtención del extracto, se proceda a la de evaluación del mismo, para el cual el método elegido fue un análisis cromatográfico; La HPLC (High performance liquid chromatography), según Bermejo, F. (1991) es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y

una fase estacionaria. Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, D. 2001). Se puede decir, de una manera simplificada, que la Cromatografía líquida de alta resolución es un procedimiento que permite la detección de compuestos específicos presentes en una muestra líquida. El resultado final de éste análisis es un Cromatograma.

Población y muestra

La población a considerar estará constituida por 300 gramos de hojas de Neem tomadas de un árbol único ubicado en la Urbanización Los Colorados, Valencia Edo. Carabobo, las cuales fueron posteriormente secadas mediante aireación en sombra.

Instrumento de recolección de datos

La recolección de información se realizó mediante la utilización de una serie de aparatos especializados. Para el proceso de extracción se utilizaron los siguientes instrumentos: Balanza analítica, botellas de muestreo de vidrio transparente calibradas (Tipo Wheaton), Rotaevaporador YAMATO modelo AB100, embudo de separación y Botellas color ámbar, así como entre los materiales, se utilizaron Etanol y Diclorometano. Para la Prueba HPLC, se utilizaron los siguientes instrumentos: Balón de 5ml, Cromatógrafo líquido HPLC, con Bomba Cuaternaria (Marca Dionex, modelo UVD 1705). Para el ensayo piloto, se utilizaron los siguientes instrumentos: Tubos de ensayo, pipetas, Cronómetro

Técnica de Análisis

Para la obtención de los resultados finales de este estudio, se llevó a cabo una fase experimental para la obtención del aceite esencial, por lo cual se siguieron una serie de procedimientos químicos y de análisis. Estos procedimientos de plantean son los siguientes: seguidamente: (a) Extracción del aceite de la hoja con solvente y (b) Prueba de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

Posteriormente, el aceite esencial fue utilizado para un estudio de factibilidad funcional, durante el cual, un ensayo in Vitro de bacterias bucales en anaerobiosis fue tomado como patrón de resistencia

Los hallazgos obtenidos durante la elaboración del presente proyecto, reflejaran los aspectos básicos en cuanto a las propiedades aplicables del Neem, tal como se ha mencionado con anterioridad, cuyo núcleo de investigación, en éste caso particular fue evaluar su efecto bactericida mediante una cepa piloto de bacterias en condiciones de anaerobiosis. Mediante la profundización con respecto a los resultados del estudio piloto, se propone seguidamente en este estudio la realización del procedimiento in Vitro antes planteado, tomando en cuenta las concentraciones y repeticiones pertinentes en cuanto a validez e importancia investigativa, considerando, de esta forma, la posibilidad de inclusión del Neem como alternativa en el tratamiento de la Gingivitis asociada a Placa.

CAPITULO IV

Parámetros a seguir para la determinación de la concentración ideal de aceite esencial puro de hojas de Neem a través de la realización de un estudio In Vitro.

En este capítulo se propone la realización de un estudio In Vitro, con la finalidad de determinar la concentración ideal de aceite esencial a base de Neem que resulte terapéutica en cuanto a la actividad bactericida en bacterias periodontopatógenas.

Para el reforzamiento de la factibilidad de este estudio, se determinó un procedimiento de extracción del aceite esencial de hojas de Neem, y su respectivo análisis como se describe seguidamente.

1) Desarrollo de aceite esencial puro de hojas de Neem

Para la obtención del aceites esencial, se llevaron a cabo una serie de procedimientos, con la finalidad de extraer la sustancia de interés y analizar la presencia del compuesto activo denominado Azadiractina. Seguidamente, se exponen los pasos llevados a cabo durante el procedimiento:

a) Extracción del aceite de la hoja con solvente.

En base al estudio realizado por Arias, D. (2005), se utilizó la hoja del Neem como materia prima para la extracción, debido a que ésta contiene mayor cantidad de azadiractina.

Las hojas de Neem fueron tomadas de un árbol único ubicado en la Urbanización Los Colorados, Valencia Edo. Carabobo. Las hojas fueron secadas mediante aireación en sombra.

El procedimiento elegido para la obtención de aceite de la hoja se realizó de acuerdo al Protocolo de Williams, D. (2004), United Patent Application Código 20040116719, el cual consiste en lo siguiente:

- Se pesan 100 grs. de hojas secas en una balanza analítica y se colocaron en botellas de muestreo de vidrio transparente (Tipo Wheaton), agregándose 200 ml. de solvente orgánico (Etanol), como se observa en las figuras 4 y 5. Dichas muestras se colocaron en agitación suave por 24 horas (Fig. 6); Este proceso se hizo por triplicado.
- Posteriormente, se separa el extracto alcohólico de las muestras tratadas, por medio de filtrado al vacío. Este extracto se rotaevaporó en un equipo YAMATO modelo AB100 para destilar el Etanol del extracto, obteniendo así el extracto puro de hojas de Neem, el cual presentó una coloración verdosa. Luego se añadieron 30 ml. de Diclorometano en agitación por 45 minutos. La mezcla obtenida se trasvasó a un embudo de separación, extrayendo así la fase orgánica y la fase acuosa (Figs 7 y 8).
- La fase orgánica se destila a través del Rotaevaporador, para separar el extracto de Neem del Diclorometano (Fig. 9), y así obtener un extracto concentrado de Neem al realizar la extracción del Diclorometano. Este extracto se almacena en una botella ámbar en un congelador a 5° C. De esta forma se obtiene el extracto puro de hojas de Neem (Fig. 12).

**b) Prueba de HPLC (High Performance Liquid Chromatography).
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.**

Luego de la obtención del extracto, se llevó a cabo el proceso de evaluación del mismo, para el cual el método elegido fue un análisis cromatográfico; La HPLC (High performance liquid chromatography), según Bermejo, F. (1991) es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria. Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, D. 2001). Se puede decir, de una manera simplificada, que la Cromatografía líquida de alta resolución es un procedimiento que permite la detección de compuestos específicos presentes en una muestra líquida. El resultado final de éste análisis es un Cromatograma.

- a. Al inicio del procedimiento se toma una muestra del extracto de Neem de 0.25 ml. aproximadamente, agregando 4.75 ml. de Acetonitrilo, utilizado para crear una solución de 5 ml (Figs 13 y 14).
- b. La muestra se analiza en el cromatógrafo líquido HPLC, el cual cuenta con una Bomba Cuaternaria (Marca Dionex, modelo UVD 1705). Este cromatógrafo líquido HPLC realiza su corrida cromatográfica dando como resultado un cromatograma, expresando la presencia de compuestos activos en el extracto de hojas de Neem (Figs 15 y 16).
- c. Las condiciones experimentales utilizadas en el equipo para el análisis son 40:60 de Acetonitrilo y Agua, respectivamente, por espacio de 5 minutos hasta un gradiente lineal de 100% Acetonitrilo por 3 minutos, en un rango de trabajo de 217 nm y un volumen de muestra de 1ml/min.

Para el análisis de los resultados arrojados en el cromatograma, se tomó como referencia la Curva de Calibración de Azadiractina (Fig. 1), en el estudio de Arias, D. (2005), realizada en el mismo equipo, bajo las condiciones antes mencionadas.

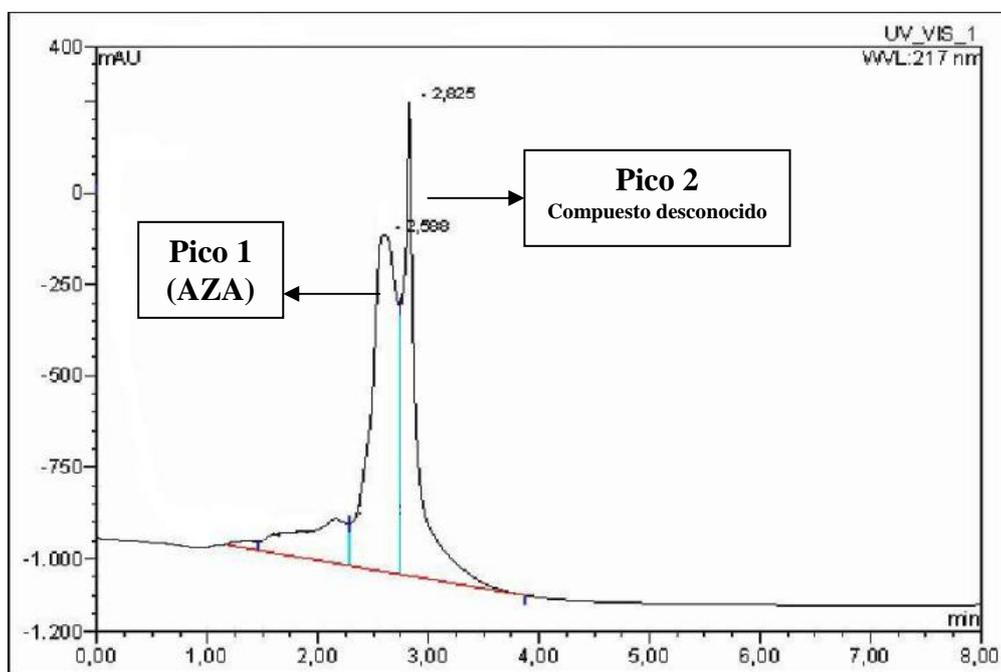


Fig. 1: Cromatograma del aceite esencial de la hoja de Neem

c) Análisis del Aceite esencial a base de Neem. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

En la figura nº 1 se muestra el resultado del cromatograma realizado, utilizando la longitud de onda requerida para la identificación de la Azadiractina (217 nm). Este cromatograma obtenido muestra dos picos, de los cuales se analizaron: (a) El tiempo de recorrido y (b) Área cubierta.

Estos dos picos arrojados en el cromatograma, cubren áreas y alcanzan alturas significativas, y señalan la presencia de Azadiractina. Como se ha mencionado en éste trabajo, existen distintos isómeros de la Azadiractina (desde Azadiractina A, hasta Azadiractina K), representando

la Azadiractina A un 84% de cantidad y siendo la Azadiractina B el segundo isómero más abundante (Ramos Sanchez, s.f.).

La corrida cromatográfica del Pico 1 (Fig. 1) se evidenció a partir de los 2,59 minutos, lo cual representa el tiempo de absorción de la Azadiractina. El recorrido gráfico dio como resultado un pico de 249, 306 mAU (unidades de masa atómica). Esto es compatible con la presencia de Azadiractina A. Luego de esto, se evidencia el Pico 2, cuya área registrada resulta menor a la del primer pico; éste se registra a los 2,83 minutos (lo cual representa el paso de la fase estacionaria a través de la columna del cromatógrafo) y muestra un área de 184, 001 mAU. Debido a la presencia de isómeros y a la longitud de onda utilizada para la detección, se presume que el Pico 2 corresponde a la presencia de otro isómero de la Azadiractina, el cual podría estar representado (de acuerdo a la bibliografía citada), por otro isómero de este compuesto.

Es importante señalar que, el área abarcada al realizar una regresión lineal, permite obtener la cantidad de Azadiractina presente en el extracto. Esto se determina por medio de la Curva de Calibración (Fig. 3), obteniendo 417 mg de Azadiractina en 0,25 ml de extracto. Al regresar el factor de dilución, se obtiene una concentración máxima de 1980 mg de Azadiractina en 300 grs de hoja, mientras que en la Curva de Calibración del estudio de Arias (Fig. 2), se expresa una cantidad de 2434,36mg de Azadiractina en la hoja de Neem.

Por otro lado, es importante destacar que la presencia de coloración verdosa señala la presencia de clorofila en el extracto, cuya absorción en el HPLC no se evidencia en el gráfico, ya que bajo las condiciones experimentales utilizadas no es detectable, debido a que la longitud de onda requerida para su detección es 430 nm para clorofila a, y 450 nm para clorofila b, y por ende se requiere de otro análisis cromatográfico y el empleo de la longitud de onda específica para para su detección, además

de un patrón de clorofila a fin de poder cuantificar la cantidad de ésta en el extracto.

Recursos físicos y humanos para la extracción y análisis del Aceite esencial puro de Hojas de Neem.

El procedimiento para la obtención del aceite esencial se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Orgánica, perteneciente al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, con la colaboración del Dr. Daniel Arias y Willmer Acosta.

Para el análisis cromatográfico, se utilizaron las instalaciones ubicadas en el Laboratorio de Residuos de la Coordinación de Ingeniería Sanitaria. Dirección General de salud Ambiental y Contraloría Sanitaria. Rama del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (Maracay, Edo. Aragua, 19 de Enero, 2006), con la colaboración del Lic. Juan Uztaris, encargado de dicho Laboratorio para la fecha.

Recursos económicos para la extracción y análisis del Aceite esencial puro de Hojas de Neem.

Tomando en cuenta la utilización de equipos y otros materiales, se elaboró un estimado de costos para la extracción y análisis del aceite esencial de Neem.

Tabla N° 1: Estimado de costo para la obtención y análisis del Aceite esencial puro de hojas de Neem

Preparación/Botella de Muestreo	Bs
Uso instrumental básico (B. Wheaton, pipetas calibradas, etc.)	1.500
Pesada en Balanza analítica	500
Uso de Rotaevaporador	500
Etanol (200 ml)	5.600
Diclorometano (30 ml)	1.320
Hojas de Neem (100 grs)	100
Total de Costo/Botella preparada	9.520
Total/3 Botellas preparadas	28.560
Prueba HPLC	200.000
TOTAL	228.560

En la Tabla 1, se expresa un presupuesto estimado, haciendo referencia de los instrumentos y materiales utilizados para obtención del aceite esencial. Los instrumentos especializados que han sido utilizados son costosos; Las instalaciones públicas institucionales y no-institucionales descritas en Recursos físicos y humanos fueron utilizadas para la realización de estos estudios experimentales, siguiendo las formalidades pertinentes. El acceso a instrumentos y materiales especializados, se hizo posible mediante la colaboración de las instalaciones mencionadas anteriormente. El equipo utilizado en la Facultad de tecnología (Rateovaporador, Instrumental básico, balanza analítica, etc), está valorado en Bs 20.000.000 aproximadamente; el cromatógrafo HPLC utilizado en el Ministerio de Salud y Desarrollo Social se valora en aproximadamente 120.000.000 de bolívares. Estos

constituyen, como se mencionó, equipos especializados, cuyo uso se puede canalizar como se mencionó anteriormente. Además, es importante mencionar la existencia de todos estos equipos en esta ciudad, lo cual facilita la realización de estos estudios. En cuanto a los procedimientos realizados, el estimado de costo total para la preparación de 100 gr de Hojas de Neem (1 Botella Wheaton) en de 9520. En este estudio se prepararon 3 botellas, y el costo estimado fue Bs 28.560. La realización de la prueba HPLC tiene un costo de Bs 200.000, y por lo tanto el procedimiento realizado da como resultado una cifra de 228.560 bolívares.

2) Determinación de la concentración ideal de aceite esencial de hojas de Neem a través de un estudio In Vitro.

Luego de haber elaborado y analizado el aceite esencial puro de hojas de Neem, como recurso para su evaluación bactericida, se propone la realización de un estudio In Vitro, cuyo objetivo general es determinar la concentración ideal de extracto de hojas de Neem necesaria para el alcance de un efecto antibacteriano ante cepas periodontopatógenas. Por medio de los parámetros que se plantean a continuación, se persigue la obtención de dicha concentración, mediante la determinación de:

- Inhibición del crecimiento bacteriano en los patrones de resistencia.
- Tiempo de Contacto ideal.

Procedimiento. Prueba de Macrodilución por contacto en anaerobiosis.

El procedimiento a seguir para la Prueba de macrodilución por contacto anaeróbico es el siguiente:

- Se coloca caldo tioglicolato en un tubo de ensayo con parafina, y se monitorea el crecimiento bacteriano en una campana de

- anaerobiosis, con la finalidad de realizar una evaluación control para garantizar la condición aséptica del caldo, y descartar la presencia de otras bacterias que interfieran en la presente evaluación. Se verifica el monitoreo mediante una tinción de Gram.
- Obtención de las cepas periodontopatógenas (Patrón de resistencia), mediante aislamiento de los grupos morfológicos necesarios para el estudio.
 - Los patrones de resistencia son inoculados en los tubos con caldo tioglicolato previamente evaluado, y se monitorea el crecimiento de estas a 37°C colocando parafina y siendo introducidos en la cámara de anaerobiosis. Se realiza una tinción de Gram y se observan los grupos morfológicos de interés.
 - Se prepararan 3 diluciones diferentes del producto bactericida a concentraciones distintas. En este caso se proponen: 2%, 3% y 5%.
 - Se exponen dichas soluciones a los patrones de resistencia, y se evalúan a diferentes tiempos de contacto: 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.
 - Finalmente se obtiene la concentración ideal y el tiempo adecuado, de acuerdo a la interacción observada en cada uno de los ensayos.

Recursos físicos y humanos

La Prueba de Macrodilución por contacto se llevará a cabo en la Unidad de Microbiología Ambiental (UMA), perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, cuyo Director para la fecha (2006, Marzo 07) es el Dr. Luis Medina. Este laboratorio cuenta con el trabajo de bioanalistas especializadas en el área ambiental, quienes se encuentran entrenados para realizar este procedimiento.

Recursos económicos

Seguidamente, se presenta el estimado de gastos económicos, requerido para la realización del estudio propuesto:

Tabla 2: Estimado de costo. Prueba de Macrodilución por contacto en UMA (Unidad de Microbiología Ambiental)

Prueba de Macrodilución por contacto	Bs
Costo por concentración manejada	120.000
Total por 3 concentraciones	360.000
Aislamiento de cepas patógenas	60.000
Total aislamiento (en caso de aislar 3 bacterias periodontopatógenas principales)	180.000
TOTAL	540.000

En la Tabla 2, se expone el presupuesto elaborado en base a los datos suministrados por la UMA (Unidad de Microbiología ambiental), en cuanto al costo de la realización de la Prueba de Macrodilución por contacto anaeróbico. Además de este estudio, se elaboró un presupuesto sobre aislamiento de cepas patógenas, ya que la identificación y monitoreo de los microorganismos periodontopatógenos específicos, facilitará la fundamentación y validez, a la vez que permitirá un mayor control y especificidad en cuanto a capacidad bactericida ante los distintos grupos bacterianos. El costo para el aislamiento de las cepas bacterianas es de Bs 60.000 c/u, y la prueba de macrodilución por contacto es igual a 120.000. Carranza (2003), menciona en su libro (Ver Cap. II, Pag. 25) nueve especies bacterianas predominantes en los trastornos periodontales que pueden ser tomados en cuenta para su aislamiento.

Curvas de calibración utilizadas en el estudio del Azadiractina

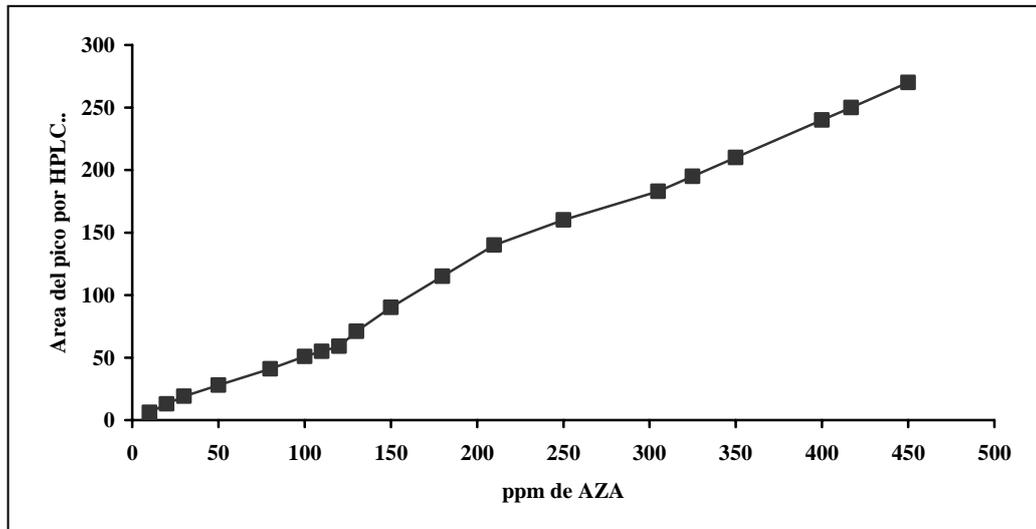


Fig. 2: Curva de calibración de Azadiractina (Arias, 2005)

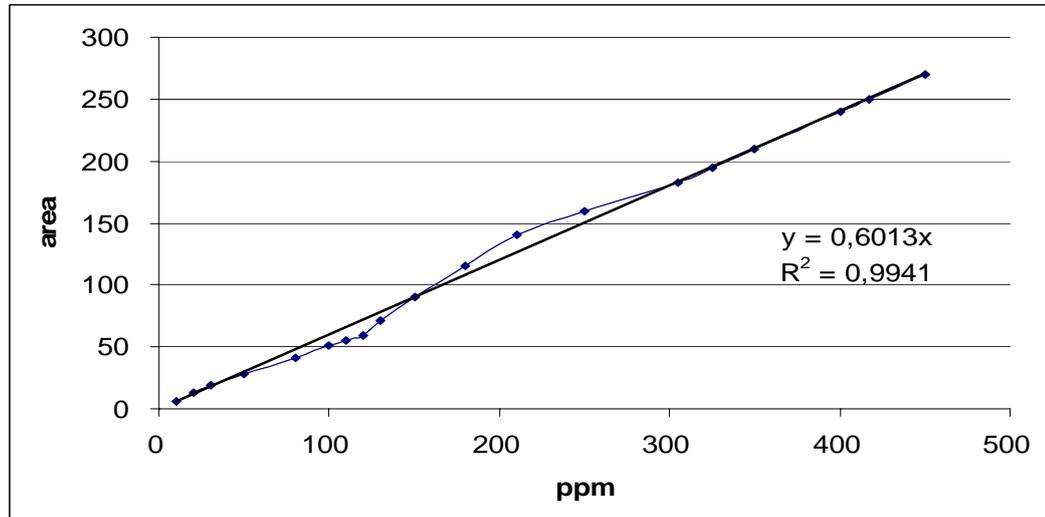


Fig. 3: Curva de Calibración de Azadiractina (Estudio actual)

Extracción del aceite de la hoja con solvente



Fig. 4: Hojas de Neem en botellas de muestreo con Etanol agregado



Fig. 5: Botellas de Muestreo Tipo Wheaton calibrada (300 ml)



Fig. 6: Proceso de agitación (24 horas)



Fig. 7: Embudo de separación: Fase orgánica y fase acuosa del aceite



Fig. 8: Obtención de la fase orgánica



Fig. 9: Destilación de la fase orgánica en el Rotaevaporador



Fig. 10: Fase orgánica en proceso de destilación

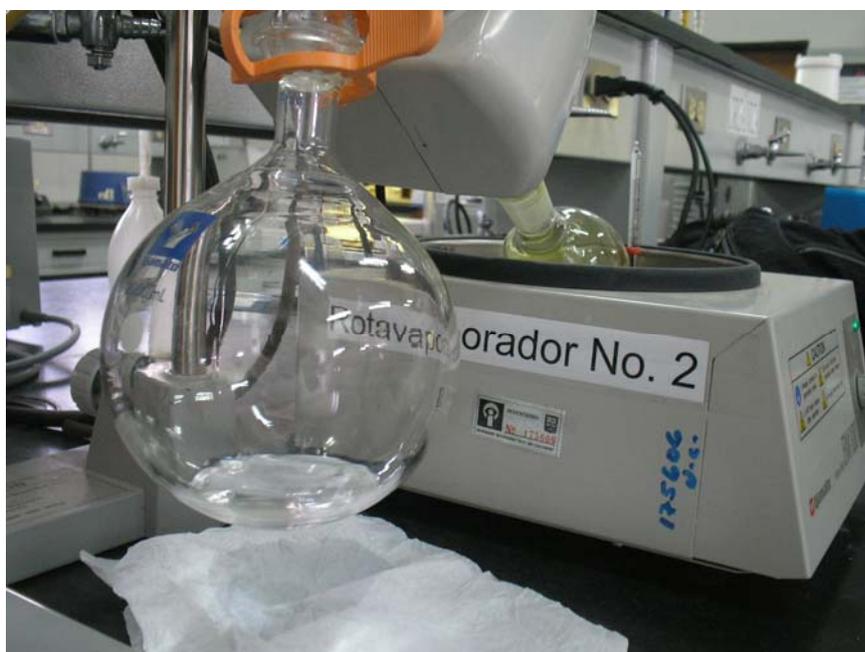


Fig. 11: Solvente destilado del extracto



Fig. 12: Obtención de aceite esencial puro de Hojas de Neem.
Envasado en frasco color ámbar

**Prueba de HPLC (High Performance Liquid Chromatography).
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia**



Fig. 13: Preparación de la solución para la corrida cromatográfica

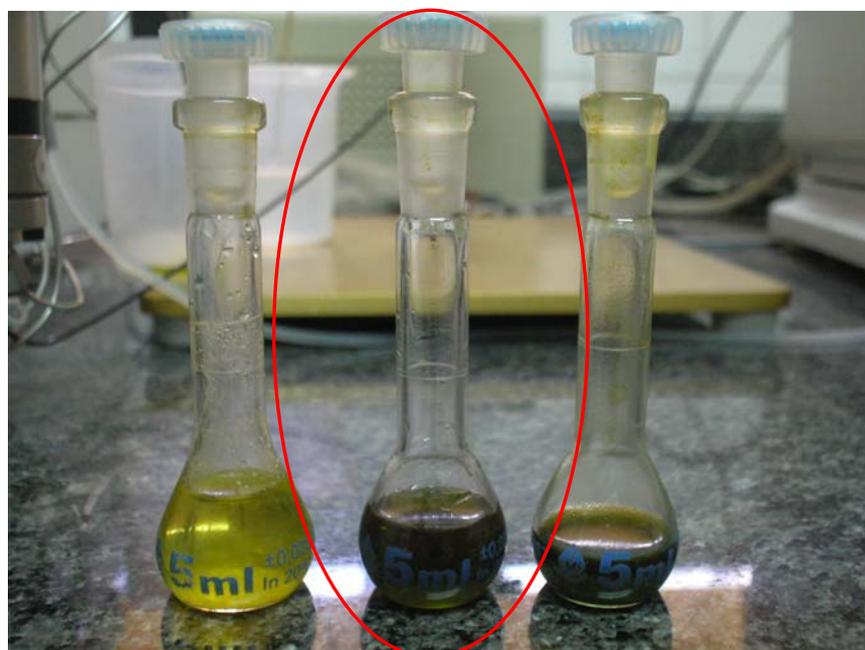


Fig. 14: Solución lista para el análisis



Fig. 15: Colocación de la muestra en el cromatógrafo líquido HPLC



Fig. 16: Observación de la corrida cromatográfica en el equipo

CAPÍTULO V

PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Evaluación de la factibilidad funcional del aceite esencial puro de hojas de Neem a través de un estudio In Vitro de bacterias bucales en anaerobiosis. Prueba de Macrodilución por contacto anaeróbico.

García Rodríguez, J. y col (2000), expresan que la prueba de macrodilución por contacto es un método de dilución para la cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos. Estos métodos se evalúan habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución, y se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Ensayo piloto. Macrodilución por contacto en anaerobiosis

En éste trabajo se hizo uso de una cepa anaerobia, para evaluar la interacción del microorganismo con el extracto en relación con la propiedad bactericida del Neem. El procedimiento a se explica seguidamente:

- Se colocó caldo tioglicolato en un tubo de ensayo con parafina, y se monitoreó el crecimiento bacteriano en una campana de anaerobiosis, tal como se describió en el Capítulo IV.
- Se obtienen muestras de bacterias bucales no identificadas de los espacios interdetales de un paciente.

- Se elaboró un pool bacteriano de las muestras recolectadas utilizando caldo tioglicolato y parafina, para inhibir el intercambio de oxígeno. (Fig. 17).
- Se prepararon 4 de estos tubos de ensayo para ser evaluados a cuatro tiempos de contacto distintos, y se incubaron las bacterias a 37°C por un período oscilante entre 24 y 48 horas, para monitorear el crecimiento bacteriano (Figs 18 y 19).
- Luego de transcurrido este tiempo, los patrones de resistencia son inoculados en los tubos con caldo tioglicolato previamente evaluado, y se monitorea el crecimiento de estas a 37°C colocando parafina y siendo introducidos en la cámara de anaerobiosis. Se realiza una tinción de Gram y se observaron los grupos morfológicos.
- Se preparó una dilución del producto bactericida al 2%.
- Se expuso dicha solución al patrón de resistencia, y se evaluó a diferentes tiempos de contacto: 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.
- Se monitorean los tubos de ensayo, y se realizó una tinción de Gram a cada tiempo de contacto para observar el crecimiento bacteriano. Se toma nota de los resultados.

Este procedimiento se llevó a cabo en la Unidad de Microbiología Ambiental, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, cuyo Director para la fecha (2006, Marzo 07) es el Dr. Luis Medina.

El Pool bacteriano elaborado de bacterias bucales está compuesto por microorganismos anaerobios no identificados, obtenidos de los espacios interdetales de un solo paciente.

Análisis de resultados

Tabla N° 3: Evaluación bactericida de Aceite de hojas de Neem. Macrodilución por contacto en anaerobiosis.

	Tiempo de Contacto			
	1 min	5 min	15 min	30 min
Microorganismos bucales	C	C	S/C	S/C

C: Crecimiento

S/C: Sin Crecimiento

Análisis de los Resultados.

De acuerdo a lo observado en la Tabla 1, el extracto de Neem no mostró poder bactericida a tiempos de contacto cortos (1 min, y 5 min), frente a bacterias anaeróbicas bucales; por otro lado, el producto presentó Crecimiento bacteriano Negativo a los 15 minutos de contacto (Fig. 25).

Tomando en cuenta lo anterior, la acción bactericida del aceite esencial se observó a los 15 minutos, de acuerdo a este ensayo, utilizando una concentración experimental de extracto de hojas de Neem al 2%. De igual forma, se realizó una tinción de Gram para monitorear el contenido bacteriano, lo cual confirmó los resultados que pueden observarse en las Figuras 23, 24, 25 y 26.

Ensayo In Vitro. Prueba de Macrodilución por contacto anaeróbico



Fig. 17: Pool bacteriano (Microorganismos bucales), elaborado de la muestra obtenida de los espacios interdentales



Fig. 18: Se introduce caldo tioglicolato en los tubos



Fig. 19: Se toma las muestras del Pool bacteriano para ser introducidas en los tubos con caldo tioglicolato



Fig. 20: Se coloca parafina en los tubos para inhibir el intercambio de oxígeno



Fig. 21: Se elabora la suspensión de Aceite esencial de Neem al 2%



Fig 22: Tubos preparados para el monitoreo a los distintos tiempos de contacto

Monitoreo de crecimiento bacteriano en los tubos de ensayo



Fig. 23: Crecimiento bacteriano a 1 minuto
(Positivo)



Fig. 24: Crecimiento bacteriano a los 5 minutos
(Positivo)



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los trabajos citados en este proyecto, cuyas aplicaciones, en su mayoría, han sido distintas al ámbito odontológico, representan sólo la necesidad de apertura de estudios de investigación que permitan el análisis profundo de los aspectos de interés en nuestra área; Los hallazgos obtenidos durante la elaboración del presente proyecto, reflejan los aspectos básicos en cuanto a las propiedades aplicables del Neem como se ha mencionado con anterioridad. La posibilidad de inclusión del Neem como alternativa en el tratamiento de la Gingivitis asociada a Placa representa una opción de considerable factibilidad; debido a la falta de investigaciones que sustenten el uso del Neem para la salud bucal y general, la ejecución de múltiples estudios experimentales es irrevocablemente necesaria antes de plantear la realización de un estudio en pacientes humanos, entendiéndose así, que “la información manejada hasta ahora es insuficiente para fundamentar la realización de un estudio in vivo”, ya que diversas variables de suma importancia deben ser tomadas en cuenta, aún luego de realizado el estudio que se ha propuesto en las paginas anteriores

El ensayo piloto in Vitro arrojó una inhibición de crecimiento bacteriano a los 15 minutos de contacto, utilizando una concentración de 2% de aceite esencial), lo cual sugiere, al igual que la bibliografía, la acción del Neem a concentraciones bajas. Sin embargo, estos datos deben ser corroborados mediante la realización de una estudio de mayor profundidad, tal como lo es el estudio que aquí se propone, constituido por la utilización de diferentes concentraciones de aceite a repeticiones mayores, que favorezcan la confiabilidad y validez de los resultados.

Durante el procedimiento de extracción del aceite esencial y el posterior análisis del mismo mediante HPLC, se obtuvo información acerca de la presencia del compuesto activo de mayor cantidad denominado Azadiractina. El cromatograma suministrado reveló que el

contenido de Azadiractina registrado en el extracto de hoja de Neem fue de 1.980 mg, tomando como referencia el estudio Arias, D. (2005), en el cual la cantidad fue mayor, pero, a pesar de esto, la presencia de Azadiractina en el presente estudio resulta significativa. De igual forma, se evidenció una coloración verdosa compatible con la presencia de clorofila, aunque este compuesto no es detectado en la HPLC realizada, ya que existe una discrepancia entre las longitudes de onda utilizadas para la detección de cada compuesto. Por lo tanto, de igual forma se recomienda la realización de otros estudios para la detección de la clorofila y su análisis cromatográficos utilizando la longitud de onda apropiada.

La existencia de estudios previos, tales como el de Gispert Abreu, E. y col (2001), revelan utilidades de la clorofila para combatir la formación de placa bacteriana, así como la distribución de productos a base de clorofila en el mercado, que tienen utilidad odontológica, representan un factor de importancia en este estudio. La concordancia entre las utilidades de la Azadiractina y la clorofila en el ámbito odontológico, y la presencia de ambos compuestos en el extracto estudiado, abren la posibilidad de la obtención de un efecto combinado sobre el estudio in Vitro, lo cual determina que la efectividad bactericida obtenida en el ensayo piloto, no puede ser atribuida a la Azadiractina únicamente. En tal sentido, la evaluación de diversas técnicas que permitan aislar de manera individual los compuestos de interés (Azadiractina y clorofila) y sus respectivos análisis, deben ser consideradas, para de esta forma determinar la acción de los compuestos de forma individual.

Luego de reflejar la importancia del estudio que en estas paginas se propone, debe concluirse que estudios posteriores deben ser realizados concernientes a ésta área. La propuesta planteada en este trabajo pretende abrir la brecha hacia una visión a largo plazo, y sustentar, de alguna forma, la realización de otros estudios experimentales in Vitro que deben ser continuados para la obtención de resultados valiosos. De igual forma, debe destacarse una vez más la insuficiente fundamentación que

hasta los momentos se maneja para la realización de un estudio en humanos. La experimentación en animales debe estar contemplada, de manera de evaluar otros aspectos, tales como la presencia de valores de toxicidad y comportamiento del tejido periodontal i vivo a corto y largo plazo.

En consideración a esto, es importante de igual forma destacar que, múltiples estudio deben ser llevados a cabo, la apertura de una línea de investigación para la realización de los mismos es una opción importante para el progreso de estudios sustentados y programados de forma cronológica, en busca de la obtención paulatina de respuestas y herramientas desde el punto de vista investigativo que sugieran un estudio en pacientes humanos, que este debidamente fundamentado.

La elaboración futura de productos de uso odontológico tales como cremas dentales y enjuagues bucales a base de Neem, constituye la meta final de este trabajo, tomando en cuenta que esto depende consecuentemente de la elaboración de los estudios pertinentes que fundamenten su formulación y fabricación en el futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arias, D., Acosta, W., Montañez, L. (2005) *Determinación del Azadirachtina de los aceites esenciales del Arbol de Neem (Azadirachta indica)*. Departamento de Química. Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo.

Carranza, F. y col. (2004) *Periodontología clínica*. Editorial Mc Graw-Hill. Los Angeles, California.

Díaz Blanco, M., García Cabrero, A., Guadaño Rocha, V., Martín Sebastián, L., Moranchel Cortezón, G., Ricote, A. (s.f) *Cromatografía. Principios y aplicaciones*. Disponible: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/trabajo050405.doc

García Rodríguez, J. y col (2000) *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap11.htm>

Gispert Abreu, E. et al (2001) *Evaluación de una crema dental con extracto de cuproclorofila*, Centro Provincial de Investigaciones Estomatológicas. Revista Cubana Estomatológica Vol 38 (3) pags 149-154 Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/est/vol38_3_01/est01301.htm

Farías Rodríguez, F. (1999). *Compendio de Microbiología bucal*. Fondo Editorial Tropikos. Caracas, Venezuela.

Montañez, L. (2005) *Desarrollo de un Bioinsecticida a partir de la azadirachtina presente en el aceite de Neem (Azadirachta indica)*. Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Carabobo.

Orozco, C., Labrador, M y Palencia de Montañez, A (2002). *Manual teórico-práctico de metodología para tesis, asesores y tutores de trabajos de grado y acenso*. Editorial Ofimax de Venezuela

Shultz, E. y col. (1992) *Neem, a tree for solving global problems*, Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Research Council.

Sierra C. (2004). *Estrategias para la elaboración de un proyecto de investigación*. Venezuela. Insertos médicos de Venezuela C.A

Sosa I., Alarcón M., Araujo L., Lucena M, Corao G., Gualtieri M., y Cova J, (2005) *Estudio de la toxicidad del extracto del fruto de la Azadirachta indica en células mononucleares humanas de sangre periférica*. Laboratorio de Investigaciones en Bioquímica. Laboratorio de Investigación de Medicamentos Orgánicos. Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. Disponible: <http://www.asovac.org.ve/ca/sesion/166.html>

Villalobos O., Salazar C., y Ramírez de Sánchez G. (2001) *Efectos de un enjuague bucal compuesto de aloe vera en la placa bacteriana e inflamación gingival* [Documento en línea] Disponible: http://www.actaodontologica.com/39_2_2001/efecto_enjuague_bucal.aspen

ANEXOS



Árbol de Neem (Urb. La Esmeralda. San Diego, Edo. Carabobo)



Árboles de Neem (Entrada de C.C. Fin de Siglo. San Diego, Edo. Carabobo)



Hojas del árbol de Neem (Av. Manuel Feo la Cruz. Mañongo. Valencia, Edo. Carabobo)



Enjuague bucal a base de Neem fabricado por un laboratorio mexicano (Monterrey, N.L.)



Partículas sólidas encontradas en la solución



Cambio de color de los productos



Información del producto



Estado del sellado observado en los envases



El producto no muestra especificaciones en cuanto a su Composición Química y dosificación. De igual forma, no se observa Código de registro