

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA DE LA GAVILANA  
(*NEUROLAENA LOBATA*) SOBRE *STREPTOCOCCUS  
MUTANS*, MICROORGANISMO RESPONSABLE DE  
LAS CARIES**

**DANIELA LEITÓN ZAMORA**

**TUTOR: LIC. JAVIER RODRIGO ALPÍZAR  
CORDERO**

**SAN JOSE, COSTA RICA, JULIO, 2020**

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecerle a Dios por acompañarme durante todo este proceso de Universidad, y permitirme culminar esta etapa de una manera exitosa.

A toda mi familia, principalmente a mis padres, porque siempre creyeron en mí y estuvieron acompañándome durante todo este proceso.

A todos los profesores, por ser quienes han guiado mi camino para llegar hasta donde he llegado y lograr convertirme en una profesional, principalmente al Lic. Javier Alpízar Cordero por acompañarme, apoyarme y ayudarme en esta investigación.

## **Dedicatoria**

A las personas más importantes en mi vida: mis padres, mis hermanos y hermanas,  
y mi abuelito que está en el cielo.

## Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
Planteamiento del Problema.....	12
Hipótesis de Investigación .....	14
Objetivos .....	14
Objetivo general .....	14
Objetivos específicos .....	14
Justificación .....	15
Proyecciones .....	17
Antecedentes.....	17
Antecedentes históricos .....	17
Antecedentes internacionales .....	18
Antecedentes nacionales .....	20
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	22
Generalidades de la Cavidad Oral .....	22
.....	23
Salud Bucodental.....	23
Biopelícula Dental.....	24
<i>Streptococcus mutans</i> .....	25
Variedad de PH .....	27
Caries dentales .....	28
Factores relacionados con el huésped .....	30
Histopatología de las caries dentales.....	32
Diagnóstico de caries dentales.....	33

	5
Placa bacteriana.....	37
Agentes antiplacas.....	39
Sustancias utilizadas para placa dental.....	40
Compuestos de amonio cuaternario .....	41
Triclosán.....	41
Fluoruros.....	43
Fenoles y Aceites esenciales .....	46
Hexetidina.....	47
Clorhexidina.....	49
<b>Mecanismo de acción:</b> .....	50
<b>Farmacocinética:</b> .....	50
<b>Concentraciones:</b> .....	51
<b>Espectro antibacteriano:</b> .....	51
<b>Toxicidad y efectos secundarios:</b> .....	52
Plantas Medicinales.....	53
Generalidades de las plantas medicinales.....	53
Neurolaena lobata (gavilana).....	53
Usos tradicionales de la gavilana.....	56
Familia Asteraceae .....	57
Metabolitos Secundarios.....	58
Alcaloides .....	58
Flavonoides.....	60
Cumarinas.....	62
Taninos .....	63
Terpenos .....	64

	6
Antraquinonas .....	65
Saponinas.....	65
Extracto .....	67
Destilación a presión reducida (rotavapor).....	67
Extracción líquido-líquido mediante el embudo separador.....	68
Forma Farmacéutica .....	73
Colutorio Antiséptico .....	73
<b>Composición de los enjuagues bucales</b> .....	75
<b>Colutorios a base de extractos naturales</b> .....	78
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....	79
Enfoque .....	79
Diseño de la investigación .....	79
Materiales y equipos usados para los extractos de <i>Neurolaena lobata</i> .....	82
Reactivos a utilizar .....	83
Procedimiento .....	84
Concentración del extracto por destilación con presión reducida .....	85
Fraccionamiento de los componentes de la hoja de <i>Neurolaena lobata</i> .....	85
Extracción.....	86
Extracto Acuoso .....	87
Extracto Etéreo.....	87
Pruebas de identificación de metabolitos secundarios utilizando el extracto etéreo .....	90
Prueba de Bornträger-Kraus.....	91
Pruebas de identificación con la muestra rotulada como AQ1 .....	94
<b>Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas)</b> .....	94

<b>Prueba de Benedict (Determinación de azúcares reductores)</b> .....	94
Pruebas de identificados a la muestra AQ <sub>2</sub> E.....	95
• Prueba de Dragendorff (Identificación de alcaloides).....	95
• Prueba de Shinoda (Identificación de flavonoides.).....	95
• Prueba de KOH (Identificación de cumarinas).....	95
• Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triterpenos).....	95
• Prueba de Bornträger-Kraus (Identificación de antraquinonas).....	95
Pruebas de identificados a la muestra AQ <sub>2</sub> E.....	95
<b>Prueba de Bornträger (Determinación de Antraquinonas)</b> .....	95
Determinación del peso seco del extracto acuoso de <i>Neurolaena lobata</i> .....	96
Elaboración del Colutorio .....	96
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b> .....	97
Obtención del extracto de <i>Neurolaena lobata</i> (gavilana) .....	97
.....	100
Nota: Elaboración propia (2020). .....	100
Fraccionamiento de los componentes de la hoja de <i>Neurolaena lobata</i> .....	101
Tabla 6. Caracterización de los extractos obtenidos a partir del fraccionamiento .....	101
Pruebas de Identificación para el tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de <i>Neurolaena lobata</i> .....	105
<b>Alcaloides</b> .....	109
<b>Cumarinas</b> .....	111
<b>Flavonoides</b> .....	113
<b>Antraquinonas</b> .....	115
.....	115

	8
.....	115
<b>Terpenos</b> .....	117
<b>Taninos</b> .....	118
Preparación del enjuague bucal .....	120
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	127
Conclusiones .....	127
Recomendaciones .....	128
REFERENCIAS .....	129

## Índice de Figuras

Figura 1. Cavity Oral _____	23
Figura 2. Streptococcus mutans _____	25
Figura 3. Distribución de bacterias en varios sitios en la boca humana _____	26
Figura 4. Factores de riesgo de caries dentales en la infancia _____	29
Figura 5. Carie dental _____	33
Figura 6. Dentina teñida para el proceso de evaluación _____	34
Figura 7. Método actual para el diagnóstico de caries (no invasivo) _____	36
Figura 8. Microorganismos más importantes presentes en la placa bacteriana supra gingival madura _____	38
Figura 9. Propiedades ideales de los agentes antiplacas _____	40
Figura 10. Estructura elemental del Triclosán _____	42
Figura 11. Tipos de administración de flúor y acción preventiva _____	44
Figura 12. Estructura química del timol _____	46
Figura 13. Fórmula estructural del mentol _____	47
Figura 14. Estructura química de la hexetidina _____	48
Figura 15. Estructura química de la clorhexidina _____	49
Figura 16. Alcohol y pH de distintos colutorios _____	52
Figura 17. Hoja adulta de Neurolaena lobata _____	54
Figura 18. Flavonoides. Estructura básica y tipos _____	61
Figura 19. Clasificación de los flavonoides _____	62
Figura 20. Estructura química de la Cumarina _____	62
Figura 21. Estructura química del ácido gálico _____	63
Figura 22. Estructura química del ácido elágico _____	64
Figura 23. Clases principales de Saponinas _____	66
Figura 24. Equipo de destilación por rotavapor _____	68
Figura 25. Montaje, Decantación y Separación de las fases _____	70
Figura 26. Montaje de equipo de extracción _____	71
Figura 27. Liberación de gas del embudo separador _____	72
Figura 28. Proceso de separación para la elaboración del tamizaje fitoquímico _____	88

	10
Figura 29. Extractos obtenidos rotulados y en recipientes _____	89
Figura 30. Dimensiones de una placa cromatográfica para TLC _____	92
Figura 31. Sistema cromatográfico _____	93
Figura 32. Hojas de Neurolaena lobata recolectadas _____	97
Figura 33. Filtrado por medio de büchner y kitasato _____	98
Figura 34. Rotavapor _____	99
Figura 35. Metodología empleada en la obtención del extracto de las hojas de Neurolaena lobata _____	100
Figura 36. Fraccionamiento de los componentes de Neurolaena lobata en botellas ámbar _____	102
Figura 37. Actividad antibacteriana de las fracciones y subfracciones de Diplostephium tolimense _____	103
Figura 38. Prueba de Dragendorff en AQ1 _____	109
Figura 40. Prueba de KOH _____	111
Figura 41. Prueba de Shinoda en AQ <sub>2</sub> E _____	113
Figura 42. Prueba de Shinoda en extracto etéreo _____	113
Figura 43. Prueba de Borträger-Kraus en AQ <sub>2</sub> E _____	115
Figura 44. Prueba de Borträger-Kraus en extracto etéreo _____	115
Figura 45. Cromatografía en Capa Fina (Revelado con vainillina y con yodo metálico) _____	117
Figura 46. Prueba de Taninos en extracto etéreo _____	118
Figura 47. Prueba de taninos en AQ1 _____	118
Figura 48. Etiqueta delantera del enjuague bucal a base del extracto acuoso de las hojas de Neurolaena lobata (Gavilana) _____	121
Figura 49. Etiqueta trasera del enjuague bucal a base del extracto acuoso de las hojas de Neurolaena lobata (Gavilana) _____	122
Figura 50. Enjuague bucal a base de las hojas de Neurolaena lobata (parte delantera) _____	124
Figura 51. Enjuague bucal a base de las hojas de Neurolaena lobata (parte trasera) _____	125

## Índice de tablas

Tabla 1. Factores de virulencia en la producción de caries.....	31
Tabla 2. Taxonomía <i>Neurolaena lobata</i> .....	54
Tabla 3. Descripción botánica de la gaviana .....	55
Tabla 4 Disolventes inmiscibles más utilizados .....	69
Tabla 5. Variables .....	81
Tabla 6 Caracterización de los extractos obtenidos a partir del fraccionamiento ..	101
Tabla 7. Obtención de la masa del extracto acuoso de las hojas de <i>Neurolaena lobata</i> .....	104
Tabla 8. Prueba a cada extracto obtenido.....	106
Tabla 9. Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>Neurolaena lobata</i> .....	107
Tabla 10. Metabolitos secundarios presentes en las hojas de <i>Neurolaena lobata</i> ..	108
Tabla 11. Formulación del enjuague bucal.....	120
Tabla 12. Características del enjuague bucal.....	126

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **Planteamiento del Problema**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020) define que:

La caries dental se produce cuando la placa bacteriana que se forma en la superficie del diente convierte los azúcares libres contenidos en alimentos y bebidas en ácidos, que con el tiempo disuelven el esmalte dental y la dentina. La ingesta abundante y continua de azúcares libres, la exposición insuficiente al flúor y la falta de remoción periódica de la placa bacteriana provocan la ruptura de las estructuras dentarias, lo que propicia el desarrollo de caries y dolor, menoscaba la calidad de vida en lo que respecta a la salud bucal y, en una etapa avanzada, ocasiona pérdida de dientes e infección sistémica. (párr. 15).

Las enfermedades bucodentales son los padecimientos no transmisibles más comunes, y afectan a las personas durante toda su vida, causando dolor, molestias, desfiguración, e incluso la muerte. Según algunas estimaciones publicadas de la OMS, en cuanto al estudio sobre la carga mundial de morbilidad del 2016, las enfermedades bucodentales afectan a la mitad de la población mundial (3580 millones de personas), siendo la caries dental en dientes permanentes el trastorno más prevalente. (OMS, 2020).

En Costa Rica, en el 2014, la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) realizó un estudio con 51.191 personas de todo el país y de todas las edades, que asistieron a la consulta odontológica, y donde se reveló que las personas entre los 20 y 49 años son quienes tienen peor higiene dental, y, por ende, tienen mayor riesgo de enfermedades en los dientes y encías. (Rodríguez, 2014, párr. 3).

Es importante destacar que:

El concepto actual contempla que varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental (*estreptococos del grupo mutans*, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*) de los cuales, *Streptococcus mutans* es el agente más importante asociado a ella. Las caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral. (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013, p. 45).

Se considera que esta bacteria (*Streptococcus mutans*) es sensible a distintos agentes antibacterianos, principalmente al flúor, la clorhexidina y el triclosán. No obstante, el uso prolongado o exceso irracional de estos productos pueden generar efectos colaterales. (Pacho, 2015, párr. 28). Por lo tanto, al haber resistencia de *Streptococcus mutans* con los tratamientos que se usan hoy en día para las caries dentales, en unos años estos tratamientos no serán efectivos, y por esta razón se pretende investigar si en un futuro la *Neurolaena lobata* (gavilana) sería un tratamiento alternativo para esta patología.

Según García (2018):

La gavilana (*Neurolaena lobata*) es una planta medicinal que desde hace mucho tiempo atrás la utilizaban para problemas estomacales, antiparasitarios, problemas a nivel de la piel, antiinflamatorio etc. Se caracteriza por ser un arbusto leñoso, de flores agrupadas y amarillas, hojas verdes y alargadas, ásperas y con dientitos. (p. 63).

En este sentido, la *Neurolaena lobata* gavilana ha sido utilizada de manera medicinal en infusiones para aliviar los problemas de salud, asociados a lo que anteriormente se ha mencionado; incluso es usada como loción y forma tópica para problemas de la piel. Esta planta, de acuerdo con lo que se ha investigado, ha dado buenos resultados en las personas que las utilizan; de ahí que tenga uso popular, y que las familias acostumbren a mantener en sus hogares este tipo de plantas, como parte de las medicinas tradicional y natural.

Al tomar en cuenta lo anterior, se pretende investigar si el uso de la gavilana puede servir para inhibir el *Streptococcus mutans*, el cual es el principal microorganismo presente

en la cavidad oral; esto les permitiría, a las personas, ampliar el uso tradicional que se le ha dado a la gabilana y, además, esas personas tendrían fácil acceso para tratar un problema común, y con su uso se previene las caries, y así se tendría una mejor salud bucodental.

En razón de ello, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Tendrán las hojas de *Neurolaena lobata* (gabilana) alguna actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* para, en un futuro, tener una alternativa natural para tratar esta patología?

### **Hipótesis de Investigación**

La *Neurolaena lobata* (gabilana) tiene efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* de manera *in vitro*.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antibacteriana de *Neurolaena lobata* (gabilana) sobre *Streptococcus mutans*, con el fin de tener una alternativa natural a partir de una planta endémica costarricense.

### **Objetivos específicos**

Elaborar un fraccionamiento de los componentes de las hojas de *Neurolaena lobata* (gabilana) utilizando hexano, diclorometano y acetato de etilo para separar los componentes del material según su polaridad.

Realizar un tamizaje fitoquímico con las hojas de *Neurolaena lobata* (gabilana), con el fin de identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas.

Preparar un enjuague bucal (colutorio) a base del extracto de *Neurolaena lobata*, como coadyuvante en la prevención de la formación de placa bacteriana.

### **Justificación**

Bosh, Rubio & García (2012) mencionan que: “Las enfermedades bucodentales constituyen un importante problema de salud pública por su alta prevalencia y fuerte impacto sobre las personas y la sociedad en términos de dolor, malestar, limitación y discapacidad social y funcional”. (párr. 1). De acuerdo con estos autores, las enfermedades bucodentales, principalmente las caries, afectan a muchas personas, debido al mal cuidado de la cavidad oral.

Pérez (2009) dice que la carie dental continúa siendo, hoy en día, una de las enfermedades orales que más afecta a la gran mayoría de la población mundial, a pesar de los avances científicos y tecnológicos, que han permitido desarrollar nuevos instrumentos y tratamientos para su detección temprana, así como una mejor comprensión de su etiopatogenia, lo cual ha determinado nuevos enfoques en cuanto al control y tratamiento de esta dolencia.

Pérez (2009) menciona que:

La cavidad oral es un sistema ecológico complejo debido a sus características anatómicas, fisiológicas y a la variedad de las poblaciones microbianas. Se ha llegado a identificar más de 700 especies bacterianas dentro de la cavidad oral consideradas en la actualidad como bacterias autóctonas en el humano. Se ha llevado a reconsiderar el papel del *Streptococcus mutans* como agente infeccioso específico en el inicio de la caries dental y, que, por el contrario, el sobrecrecimiento de este microorganismo debe explicarse por una perturbación de la homeostasis. (p. 120).

La OMS (2016) afirma que con fines terapéuticos se utilizan tratamientos para las caries dentales; estos diferentes productos de origen químico son como flúor, compuestos mineralizantes con calcio, fosfato y flúor, triclosán y la clorhexidina; sin embargo, estos generan una gran cantidad de efectos adversos, por lo que es importante crear productos de origen natural que generan una eficacia mayor o similar a los productos químicos, y así disminuir los efectos adversos.

Recientes investigaciones acerca de productos naturales han determinado que existen efectos antimicrobianos para la inhibición de los causantes criogénicos. Para profundizar el estudio de la diversidad bacteriana oral asociada a caries dental, se han aplicado diversas metodologías, dentro de las cuales destaca el estudio de alimentos, como hojas de guayaba, manzanilla, romero, piña, ruda, entre otros. (Ballesteros, 2014, p. 33).

El propósito de esta investigación es mostrar los resultados que presenten el tamizaje fitoquímico, para lograr ver cuáles metabolitos secundarios están presentes en la hoja de *Neurolaena lobata*. y así lograr determinar qué propiedades beneficiosas para la salud presenta esta planta, y de esa manera realizar un enjuague bucal a base del extracto acuoso de la hoja de *Neurolaena lobata* para que, en futuras investigaciones, a dicho colutorio se le realicen las pruebas necesarias, y así, en un futuro, pueda salir al mercado, siendo el primer enjuague bucal con *Neurolaena lobata* en su composición.

Según Hernández & Pardo (2015), dicen que, en cuanto a la producción y al uso de productos naturales, la cantidad de consumidores y aceptación van en aumento, ya que en ellos se encuentra una alternativa con menores costos económicos, más segura y saludable; además, existe la creencia de que los productos naturales no son tóxicos y no tienen efectos secundarios. (p. 11).

### Proyecciones

- Se espera lograr separar los metabolitos secundarios presentes en el material vegetal de la *Neurolaena lobata*, según sus diferencias de polaridad y afinidad a distintos disolventes.
- Se pretende poder identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Neurolaena lobata* (gavilana) mediante un tamizaje fitoquímico.
- Se procura preparar una forma farmacéutica que ayude a combatir y controlar el crecimiento del *Streptococcus mutans* en la boca, para evitar la proliferación de la caries, con base en referencias bibliográficas de artículos relacionados con la *Neurolaena lobata* (gavilana) y con las especies de la familia.

### Antecedentes

#### Antecedentes históricos

La *Neurolaena Lobata* (gavilana) es una planta centroamericana que pertenece a la familia de las *Asteraceae* utilizada en medicina tradicional en todo el Caribe y en otras partes del mundo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades de la piel, malaria, diabetes, dolor y como repelente de insectos. Varios grupos de investigadores confirmaron la actividad antiinflamatoria, antineoplásica y anti protozoaria de manera in vitro. (Mckinnon, 2014, p. 122).

La *Neurolaena lobata* es un arbusto que puede crecer hasta cuatro metro de altura, con hojas alargadas de aproximadamente de 5 cm a 24 cm de largo. Es nativa de los trópicos, y principalmente se puede conseguir en el Caribe y América Central. Según la información obtenida por medio de TRAMIL, *Neurolaena lobata* ha sido usada para tratar varias enfermedades como la diabetes, el dolor de estómago, el resfriado y las enfermedades que presenten fiebre- (García, Escalante & Díaz, 2007)

Ildikó, Vasas, Béni, Forgo, Binder, Bochkov, Zupkó, Krupitza, Frisch, Kopp & Hohmann (2014) realizaron una investigación sobre el extracto de hoja cruda de *Neurolaena lobata* (gavilana) y demostraron su capacidad antiulcerogénica, antinociceptiva, antiparasitaria, y su actividad antiviral. Además, se descubrió que un extracto de hoja de *Neurolaena lobata* ejerce actividad antiinflamatoria, en una prueba de edema en la pata del ratón, inducida por carragenano.

### **Antecedentes internacionales**

Según Shivananda, Ramlogan & Maharaj (2014), en el artículo “*Neurolaena lobata* L. promotes wound healing in Sprague Dawley rats”, el objetivo de esta investigación era evaluar la capacidad de *Neurolaena lobata* para curar heridas infligidas en ratas usando la herida de escisión. Los animales se dividieron en 3 grupos de 6, donde pesaban entre 200 y 220 gramos; estas ratas fueron anestesiadas con ketamina (80 mg/kg) antes y durante las heridas experimentales. Los animales del grupo de prueba fueron tratados tópicamente con el extracto etanólico de *Neurolaena lobata*; al grupo de animales de estándar y control se les trató con mupirocina y vaselina respectivamente, y el tratamiento se realizó durante 13 días.

Como resultados, se logró observar actividad antimicrobiana del extracto contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y, además, se observó una disminución significativa en el período de epitelización, con los animales del grupo de prueba, tratado con extracto, en comparación con los controles y los animales del grupo estándar. Como conclusión, se dio un aumento de la tasa de contracción de la herida y contenido de hidroxiprolina, con disminución del tiempo de epitelización en los animales tratados con extracto, y por eso apoyan una evaluación adicional de *Neurolaena lobata* como farmacoterapia para la curación de heridas.

Walshe, Choueiri, Saleem, Asim, Caal, Caal, Rojas, Pesek, Durst & Arnason (2013), en “Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass., a Q’eqchi’ Maya traditional medicine”, tuvieron el objetivo de llevar a cabo una investigación etnobotánica detallada del uso de *Neurolaena lobata* por los mayas Q’eqchi en Belice, para una variedad de síntomas inflamatorios, y evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto de la hoja y lactonas sesquiterpénicas aisladas. El

extracto crudo EtOH al 80% de las hojas de *Neurolaena lobata* redujo la producción de TNF- $\alpha$ ; por lo tanto, los resultados demuestran que se proporciona una base farmacológica y fotoquímica para el uso tradicional de esta hoja en condiciones inflamatorias. A manera de conclusión, en este estudio se respalda la hipótesis de que el extracto de las hojas de *Neurolaena lobata* posee actividad antiinflamatoria

Jian, Chen, Zhang, Zhao, Huang & Cai (2017), en el artículo “Effect of the Biofilm Age and Starvation on Acid Tolerance of Biofilm Formed by *Streptococcus mutans* Isolated from Caries-Active and Caries-Free Adults”, *Streptococcus mutans* se considera el principal microorganismo responsable de las caries dentales; la capacidad de *Streptococcus mutans* para tolerar un PH bajo es esencial para la cariogenicidad. Este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto de la edad de biopelícula, y la condición de inanición en la tolerancia al ácido de la biopelícula formada por *Streptococcus mutans*.

Se utilizó aislamiento de cepas de *Streptococcus mutans* en adultos con caries activas y sin caries y una cepa de referencia; se usaron para la formación de biopelículas; cuando estas se formaron, se expusieron a un pH de 3.0 durante 30 minutos; un pH de 5.5 durante 3 horas y un pH de 7.7 durante 24 horas; después se analizaron estas cepas, mediante tinción de viabilidad y microscopio confocal láser de barrido, y se obtuvo como resultado que la cepa con caries activas era más densa, y con una cantidad mayor de bacterias viables que la cepa sin caries y la cepa de referencia. A manera de conclusión, se obtuvo que la cepa con caries activas presentó mayor acidez, en comparación con las otras cepas, lo que indica que la colonización de alta cariogenicidad de cepas clínicas puede conducir a un alto riesgo de caries en individuos.

Juliano, Marcal & Souza (2011), en el artículo “Productos naturales: efecto antinociceptivo en ratones de un extracto hidroalcohólico de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. y sus fracciones orgánicas”, el objetivo de esa investigación es estudiar la toxicidad oral aguda del extracto hidroalcohólico de la planta y, a su vez, el efecto antinociceptivo del extracto y de sus fracciones divididas en hexano y cloroformo, administradas por vía oral en modelos de nocicepción e inflamatorios en ratones.

No se observaron signos de toxicidad para dosis orales de hasta 5000 mg kg<sup>-1</sup> en ratones. Clorhidrato de morfina (10 mg kg<sup>-1</sup>), dipirona sódica (200 mg kg<sup>-1</sup>), el extracto

hidroalcohólico (1000 mg kg<sup>-1</sup>) y sus fracciones divididas en cloroformo y hexano (100 mg kg<sup>-1</sup>) inhibieron, significativamente, la constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones (100, 95, 47, 62 y 60% de inhibición, respectivamente, en comparación con el control negativo). En la prueba de placa caliente en ratones, el clorhidrato de morfina, las fracciones divididas en cloroformo y hexano, pero no el extracto hidroalcohólico, dieron como resultado un aumento significativo de la latencia en todos los tiempos de observación.

En la constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones, el pretratamiento de los animales con naloxona revirtió significativamente el efecto analgésico de la morfina, pero no el del extracto hidroalcohólico o sus fracciones, divididas en hexano y cloroformo. Finalmente, la administración de las fracciones, divididas en hexano y cloroformo (100 mg kg<sup>-1</sup>), tuvo un efecto antiematógeno significativo en el edema inducido por carragenano en ratones.

Como conclusión, se determinó que, del extracto hidroalcohólico de *Neurolaena lobata* en partículas, sus fracciones divididas presentan propiedad analgésica significativa cuando se evalúan a través de estos modelos del dolor. Su efecto antinociceptivo podría ser resultado de la interferencia con el proceso inflamatorio.

#### **Antecedentes nacionales**

García *et al.* (2007), en el artículo “Antipyretic effect of the aqueous extract obtained from leaves of *Neurolaena lobata* (Asteraceae) on a pyretic model induced by brewer’s yeast”, el objetivo principal de la investigación que se realizó, fue determinar la actividad antipirética de los extractos acuosos de *Neurolaena lobata*, donde se utilizaron 40 ratas wister, divididas en 4 grupos de 10 animales.

Al grupo A se le administró agua destilada como placebo (2ml/animal), al grupo B se le dio acetaminofén (1000 mg/kg), el grupo C recibió el extracto acuoso de las hojas de *N. lobata* (2000 mg/kg), y el grupo D no recibió ningún tratamiento. Como resultados, se obtuvo que el grupo A no mostró ningún efecto antipirético, en el grupo B y C se mostró un efecto antipirético, y en ambos grupos el efecto se observó a los 30 minutos después de la administración. En conclusión, se logró mostrar que las hojas de *Neurolaena lobata* en solución acuosa tienen actividad antipirética. Este extracto puede ser de utilidad parcial como remedio para controlar la fiebre, en ausencia de otros medicamentos.

Alpizar, Chinchilla, Valerio, Sánchez, Bagnarello, Martínez, Gonzáles, Cordero & Rodríguez (2014), en el artículo “Actividad contra *Leishmania sp.* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de plantas en una reserva biológica de Costa Rica”, investigadores tanto de la Universidad de Costa Rica como de la Universidad de Ciencias Médicas, se unieron para buscar plantas que tuvieran componentes activos contra este parásito, ya que es una enfermedad cuyo tratamiento es sumamente difícil. Se utilizaron 67 especies de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB), entre las cuales se utilizaron *Bocconia frutescens*, *Clematis dioica*, *Cordia megalantha*, *Eugenia austin-smithii*, *Guarea bullata* y *Neurolaena lobata*, entre otras, que fueron seleccionadas para realizar este trabajo.

Para ello se prepararon extractos crudos hidro-alcohólicos de material fresco o desecado de raíz, tallo, hojas maduras o tiernas, flores y frutos inmaduros o maduros. Al usar pruebas presuntivas y luego específicas, se analizó el efecto de tales extractos sobre una cepa de *Leishmania*; como resultado se obtuvo que sí existió una ligera tendencia de positividad mayor para los extractos frescos, y la actividad se presentó en una y hasta más de cuatro partes de la planta; es importante mencionar que la mayoría de los extractos activos no fueron tóxicos.

Fernández (2012), en su artículo “Uso odontológico de propóleos de origen costarricense”, el objetivo fue determinar el nivel de efectividad antimicrobiana *in vitro* de propóleos altos en compuestos fenólicos sobre *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans*. Se midió la acción bacteriostática o bactericida del propóleo en una concentración al 50%, 70% y 80%, comparando su efecto contra el digluconato de clorhexidina al 0,12%. El análisis evidenció que el propóleo ejerce una acción bactericida sobre la especie *Streptococcus sanguinis*, independientemente de su concentración, y por otra parte sobre la bacteria *Streptococcus mutans*; las concentraciones del propóleo al 50% y 70% resultaron en acción bacteriostática.

De forma tal, se concluye que los tres extractos del propóleo generaron un efecto antimicrobiano sobre las especies *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Se concluye, también, que se obtuvieron efectos bactericidas de los extractos del propóleo, similares al gluconato de clorhexidina al 0,12%, y esto justifica que puede ser empleado

como herramienta para la prevención, o coadyuvante del tratamiento de la enfermedad periodontal, y hay reducción del riesgo de caries.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **Generalidades de la Cavity Oral**

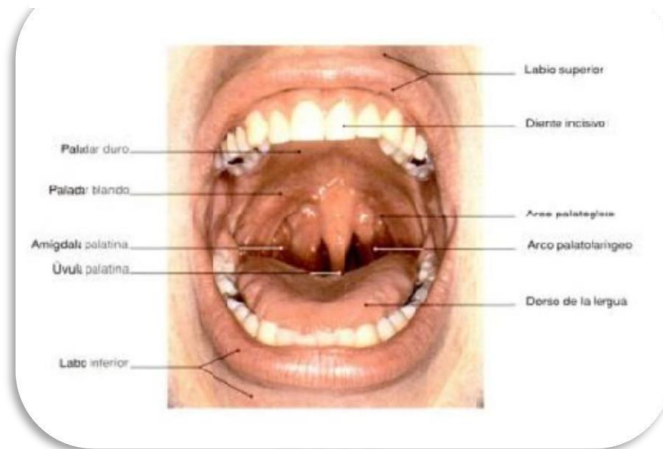
El buen desempeño de la boca juega un papel de gran importancia en la vida y salud de todo ser humano; es por esto que se debe cuidar para que cumpla correctamente con todas sus funciones. La boca está formada por los labios superior e inferiores, mejillas, dientes, muelas, encías, lengua, paladar; también posee una estructura formada por los maxilares superior e inferior, llamada mandíbula, que permite articular. (Aiepi, 2009, párr. 18).

Bordas, Flores, García, Ródenas & Martínez (s.f.) mencionan que:

El diente es un órgano duro, blanco y liso que sirve básicamente para masticar los alimentos. Está constituido macroscópicamente por tres partes: la corona, o porción situada por encima de la encía; la raíz, o porción situada por debajo de la encía, y el cuello, zona de separación entre la corona y la raíz. El esmalte, la dentina y la pulpa son los tejidos dentarios, y la encía es el tejido peridentario blando que se adhiere al cuello de los dientes, toma su forma y texturas definitivas con la erupción de los dientes. (p. 531).

La saliva es un líquido alcalino, claro y viscoso; además, es secretado por diferentes glándulas salivales. Una de las funciones principales es humedecer, lubricar los alimentos que se ingieren, y también contribuye a una limpieza de los dientes; posee una amplia acción bacteriana, amortigua la acción de los ácidos producidos por los microorganismos de la placa dental y, por último, y uno de los más importante, contribuye a la remineralización de la superficie del esmalte, por su alto contenido en iones calcio, flúor y fosfato. (Bordas *et al.*, s.f.).

**Figura 1. Cavidad Oral**



Nota: “Atlas de anatomía humana” (2016).

### Salud Bucodental

La OMS (2020) define la salud bucodental como:

La ausencia de dolor bucal o facial, de cáncer oral o de garganta, de infecciones o úlceras, de enfermedades periodontales, caries, pérdida dentaria, así como de otras enfermedades y alteraciones que limiten la capacidad individual de morder, masticar, reír, hablar o comprometan el bienestar psicosocial. (p. 13).

Por esta razón, una boca sana y un cuerpo sano van de la mano; por lo contrario, una mala salud bucodental puede presentar consecuencias desfavorables en el bienestar físico y psicosocial de la persona. La alta carga de las enfermedades bucodentales ha sido un reto de salud pública, subestimado por la mayoría de los países en el mundo. Las enfermedades bucodentales son muchas veces invisibles y ocultas, o han sido aceptadas como una consecuencia inevitable de la vida y el envejecimiento. (Federación Dental Internacional, 2015).

FDI (2015) menciona que:

La mayoría de las enfermedades bucodentales comparten factores de riesgo comunes con otras Enfermedades No Transmisibles (ENT) como son las enfermedades cardiovasculares, cánceres, diabetes y enfermedades respiratorias. Estos factores de riesgo incluyen dieta no saludable (particularmente aquellas ricas en azúcares añadidos), consumo de tabaco y alcohol. Ello origina patrones muy similares de desigualdades entre diferentes grupos de población, tanto para las enfermedades bucodentales como sistémica. (p. 14).

### **Biopelícula Dental**

Según Hojo (2009), dice que las biopelículas dentales son ecosistemas extremadamente complejos y de múltiples especies, donde las bacterias orales interactúan de manera competitiva con otros microorganismos. Las interacciones bacterianas que influyen en la biopelícula dental incluyen diferentes mecanismos. Durante la etapa inicial de la formación de biopelículas, se sabe que las células bacterianas planctónicas se unen directamente a las superficies de la cavidad oral, o se unen indirectamente a otras células bacterianas que ya han colonizado.

La placa dental es un claro ejemplo de una biopelícula y los estudios que se han realizado respecto a ello están aportando una contribución importante para el entendimiento de la etiología y posibilidades de control de las caries dentales y las enfermedades periodontales. Se consideran que las biopelículas presentan una fase de crecimiento diferente de las bacterias que se encuentran en estado planctónico; es decir, en suspensión. (Pérez, 2005).

Con el fin de identificar los determinantes ecológicos claves que influyen en los patrones de colonización, es de suma importancia comprender las propiedades de la cavidad oral. Según Pérez (2005):

En primer lugar, la boca está continuamente bañada por la saliva, manteniendo una temperatura de 35-36 °C a un pH de 6,75 7,25, condiciones óptimas para

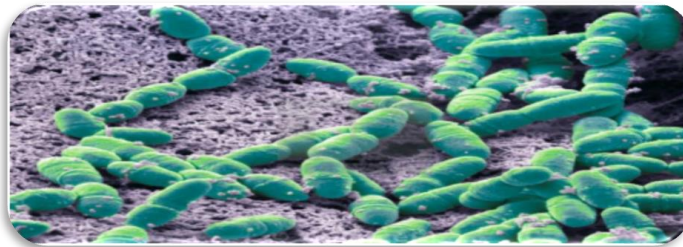
el crecimiento de muchos microorganismos. En segundo lugar, la saliva influye profundamente en la ecología de la boca. (p. 83)

### ***Streptococcus mutans***

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa dental o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental, y es la que más tiene influencia en el desarrollo de dicha enfermedad. Es neutrófilo, porque vive en medio con pH neutro, ácido génico, por metabolizar los azúcares a ácidos, y acidúrico por sintetizar ácidos, a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. (Ojeda *et al.*, 2013).

La bacteria *Streptococcus mutans* fue explicada por Clarke en 1924; sin embargo, fue hasta la octava edición del manual de Bergey donde se determinó como especie independiente. Su nombre *Streptococcus mutans* se origina de las formas variantes en que se presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido. y coco (forma redonda) en un medio alcalino. (Gamboa, 2014, párr. 28).

**Figura 2. *Streptococcus mutans***



Nota: Steve Gshmeissner (2006).

El *Streptococcus mutans* es uno de los principales microorganismos cariogénicos que están asociados a las caries dentales. De acuerdo con la hipótesis de la placa etiológica, la carie dental es la consecuencia de cambios, en los que es el balance natural de la microflora de la placa dental, causada por la alteración de las condiciones ambientales locales, se produce homeostasis microbiana oral. (Ojeda *et al.*, 2013).

La microflora oral es un complejo ecosistema, que contiene una amplia variedad de especies microbianas diferentes. La boca es colonizada por varios microorganismos antes de la erupción de los dientes. Sin embargo, los recién nacidos son libres de microorganismos. Cuando los dientes empiezan a salir, la placa dental se desarrolla en las superficies dentales expuestas, las cuales están cubiertas por una película amorfa, compuesta por glicoproteínas salivales. (Ojeda *et al.*, 2013).

Si las personas no toman las medidas de higiene oral, las superficies de los dientes acumulan grandes masas microbianas, mientras que las descamaciones de células epiteliales no permiten la acumulación en las superficies de la mucosa oral. El número de las bacterias en la placa dental puede llegar a alcanzar  $10^8$  por mg en peso húmedo. (Ojed, *et al.*, 2013).

**Figura 3. Distribución de Bacterias en Varios Sitios en la Boca Humana**

Grupo bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surcos
Gingival				
Cocos G+	28.2	44.8	46.2	28.8
Facultativos				
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitis</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos G+ anaeróbicos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos G- anaeróbicos	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos G- facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos G+ facultativos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos G+ anaeróbicos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos G- facultativos	ND	3.2	2.3	1.2
Bacilos G- anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Nota: Ojeda *et al.* (2013).

Como se muestra en esta tabla, las especies microbianas predominantes son significativamente diferentes en los sitios de su localización, independientemente de las variaciones de muestra a muestra; estreptococos, bacilos gram positivos y veillonelas comprenden la mayoría del total de recuentos viables. Sin embargo, los estreptococos conforman el mayor número del total de la población bacteriana en la placa dental. Muchos de los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. (Linossier & Valenzuela, 2011).

Parece que ciertas especies estreptocócicas orales tienen predilección por colonizar sitios particulares de la boca. *S. sanguis* y *S. mutans* preferiblemente colonizan las superficies de dientes y aparatos prostéticos. *S. salivarius* está presente en bajo número en placa, y es un colonizador primario de la boca después del nacimiento. *S. mitior* no tiene un sitio preferido en la cavidad oral. *S. sanguis* usualmente no se encuentra sino hasta la erupción de los dientes. (Linossier & Valenzuela, 2011)

De acuerdo con Linossier *et al.* (2011):

Los estreptococos del grupo *mutans* han sido estudiados usando pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares, que incluyen hibridación ADN-ADN y secuenciación de genes ARN ribosomales. Las especies más importantes en el humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes, y su patogenicidad se ha demostrado en relación con la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa. (párr. 9).

#### **Variedad de PH**

Los streptococcus del grupo *mutans* sobreviven y se desarrollan a un pH bajo y acidúrico, o también son capaces de seguir produciendo ácido a un pH bajo. Este tipo de especies bacterianas consigue alcanzar muy rápido un pH crítico, el cual es necesario para iniciar el proceso de desmineralización. El ácido génico acidúrico es importante en el proceso

de virulencia; este microorganismo produce ácido láctico a partir de la sacarosa y de otros hidratos de carbono, con mayor rapidez que otras bacterias bucales. (Moromi, 2002).

El pH de la boca se va a ver variado, dependiendo del lugar de esta que se vaya a analizar; en la parte de las piezas dentales se va a ver variado por la accesibilidad de la saliva a los diferentes sitios, y en la morfología de cada pieza, ya que es diferente en las piezas posteriores que en las piezas anteriores y en los maxilares. La disminución del pH se puede ver afectado después de la ingesta de azúcares, como la arginina, que se presenta en los pequeños péptidos, ya que las bacterias no arginólicas son aquellas que producen dificultad al aumento del pH. (Ballesteros, 2014).

Otro factor, del poco aumento del pH, se da minutos después de la ingesta de carbohidratos, produciendo la desmineralización y la remineralización, para luego ir aumentando de manera gradual, hasta que retorne a su nivel normal, aproximadamente en treinta minutos o una hora después. En la cavidad oral existen bacterias capaces de producir ácidos, que liberan grandes cantidades de  $H^+$ , lo cual hace que se vea disminuido el pH por debajo del pH crítico en zonas limitadas de la superficie del esmalte, y se inicia la descalcificación. (Núñez, García, 2010).

La teoría de descalcificación ácida requiere que los niveles de pH bajen a un nivel 4.5, en que la placa se encuentre hiposaturada con respecto a las sales de fosfato cálcico de las superficies dentales. Cuando el pH del biofilme disminuye, el número de microorganismos orales baja, mientras que las especies patógenas aumentan, provocando un desarrollo de la lesión cariosa. (Ballesteros, 2014, p. 16).

### **Caries dentales**

La caries dental es un proceso o enfermedad dinámica crónica, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos y, debido al desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante, da como resultado una pérdida de mineral de la superficie dental, cuyo signo es la destrucción localizada de tejidos duros. Se clasifica como una enfermedad transmisible e irreversible. (Núñez & García, 2010, p. 157).

La caries dental, como se mencionó anteriormente, es una enfermedad multifactorial donde va a existir la interacción de tres factores principales: el huésped (higiene bucal, saliva y los dientes), la microflora (infecciones bacterianas), y el sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, también se debe tener en cuenta uno más, el tiempo. Para que una caries se forme, es necesario que las condiciones de cada factor antes mencionado sean favorables; esto quiere decir, un huésped susceptible, una flora cariogénica, y un sustrato apropiado que debe estar presente durante un lapso de tiempo. (Núñez & García, 2010).

La caries se caracteriza por una serie de complejas reacciones químicas y microbiológicas que acaban destruyendo el diente. Se acepta que esta destrucción es el resultado de la acción de ácidos producidos por bacterias en el medio ambiente de la placa dental. Clínicamente, la caries se caracteriza por cambio de color, pérdida de translucidez y descalcificación de los tejidos afectados. A medida que el proceso avanza, se destruyen tejidos y se forman cavidades. (Miñana, 2011, párr. 5).

**Figura 4. Factores de Riesgo de Caries Dentales en la Infancia**

Hábitos alimentarios inadecuados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chupetes o tetinas endulzados</li> <li>• Biberón endulzado para dormir</li> <li>• Ingestión frecuente de azúcares y bebidas azucaradas</li> </ul>
Factores relacionados con la higiene dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteraciones morfológicas de la cavidad oral:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Malformaciones orofaciales</li> <li>– Uso de ortodoncias</li> </ul> </li> <li>• Deficiente higiene oral:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Mala higiene oral personal o de los padres y hermanos</li> <li>– Minusvalías psíquicas importantes (dificultad de colaboración)</li> </ul> </li> </ul>
Factores asociados con xerostomía	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Sjögren</li> <li>• Displasia ectodérmica</li> </ul>
Enfermedades en las que hay alto riesgo en la manipulación dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cardiopatías</li> <li>• Inmunosupresión, incluido VIH</li> <li>• Hemofilia y otros trastornos de coagulación</li> </ul>
Factores socioeconómicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo nivel socioeconómico (sobre todo si asocia malos hábitos dietéticos e higiénicos)</li> </ul>
Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Historia familiar de caries</li> <li>• Caries activas, independientemente de la edad</li> </ul>

Nota: Miñana (2011).

En la figura 4 se observan los grupos de riesgo de las caries dentales, y además es importante mencionar que las medidas de prevención de la caries dental se pueden decir que son la aplicación de flúor, higiene bucodental, medidas dietéticas y tratamiento de lesiones activas. (Miñana, 2011).

### **Factores relacionados con el huésped**

La saliva: es una solución supersaturada en calcio y fosfato que contiene flúor, proteínas, enzimas, agentes buffer, inmunoglobulinas y glicoproteínas, entre otros elementos de gran importancia para evitar la formación de las caries. (Núñez & García, 2010, p. 158). El flúor está presente en muy bajas concentraciones en la saliva; sin embargo, desempeña un papel muy importante en la remineralización, ya que cuando este se combina con los cristales del esmalte, forma la fluorapatita, la cual es mucho más resistente al ataque ácido. (Duque *et al.*, 2006).

Duque *et al.* (2006) manifiestan:

Las macromoléculas salivales están comprometidas con las funciones de formación de la película salival, adherencia y agregación bacteriana, formación de la placa bacteriana. No obstante, presentan otras funciones, como control de la microflora oral, lubricación e hidratación, mineralización y digestión, que proveen de un medio protector a los dientes. La saliva mantiene la integridad dentaria por medio de su acción de limpieza mecánica, el despeje de carbohidratos, la maduración post-eruptiva del esmalte, la regulación del medio iónico, para proveer capacidad de remineralización sin la precipitación espontánea de sus componentes, y la limitación de la difusión ácida. (párr. 19).

La microflora: del gran número de bacterias que se encuentra en la cavidad bucal, los microorganismos pertenecientes al género estreptococos, como el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*, han sido asociados con las caries, tanto en animales de experimentación como en humanos. (Núñez & García, 2010).

Colonización bacteriana: el paso más importante, para que se produzcan caries, es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva, que son absorbidas

por el esmalte dental. Para que se produzca la colonización bacteriana es imprescindible la formación previa de una fina película de proteínas de la saliva, sobre la parte de la superficie del diente. (Núñez& García, 2010).

Factores de virulencia: cuando se menciona la palabra virulencia, esta se refiere a la capacidad de producir daño; es decir, generar una enfermedad. Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microbio que lo hacen patógeno (Duque *et al.*, 2006); en el caso del *Streptococcus mutans*, los más involucrados en la producción de caries son:

**Tabla 1. Factores de Virulencia en la Producción de Caries**

<b>Acidogenicidad</b>	El <i>Streptococcus mutans</i> puede llegar a fermentar los azúcares de la dieta, para originar ácido láctico como un producto final del metabolismo; esto hace que descienda el pH y se desmineralice el esmalte dental. (Duque <i>et al.</i> , 2006, párr. 10).
<b>Aciduricidad</b>	Se define como la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo. (Duque <i>et al.</i> , 2006, párr. 10).
<b>Acidofilicidad</b>	El <i>Streptococcus mutans</i> puede llegar a resistir la acidez del medio bombeando protones (H <sup>+</sup> ) fuera de la célula. (Duque <i>et al.</i> , 2006, párr. 10).
<b>Síntesis de glucanos y fructanos</b>	Por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la bacteria a adherirse al diente, y ser usados como reserva de nutrientes. (Duque <i>et al.</i> , 2006 párr. 10).

<b>Producción de dextranasa</b>	Las bacterias tienen la posibilidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como la dextranasa y la mutanasa. Estas se disponen en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, lo hidrolizan y facilitan, así, el paso de los productos de la hidrólisis hacia el interior de la misma. (Duque <i>et al.</i> , 2006, párr. 10).
---------------------------------	---

Nota: Elaboración propia (2020).

### **Histopatología de las caries dentales**

Una de las principales manifestaciones macroscópicas que presentan las caries dentales es una mancha blanca, la cual es reversible. Si con el transcurso del tiempo esta mancha continúa expuesta a altas concentraciones de ácidos, puede llegar a una cavitación. Para poder llegar a descubrir una caries, se puede hacer mediante métodos visuales, que son las más comunes y las que utilizan los odontólogos, y también de manera táctil. (Ballesteros, 2014).

Para el análisis sistémico entre lo que es el aspecto clínico e histológico del estado progresivo de la carie dental, es indispensable lograr conocer e interpretar las características estructurales, físico-químicas y biológicas del esmalte dental en estado de salud. Se plantea, en diversos estudios, que la resistencia del esmalte dental a la desmineralización ácida está condicionada por la velocidad de difusión de los ácidos (permeabilidad) y la velocidad de disolución de los cristales que conforman los prismas. (Amarise, 2002).

Las lesiones visibles se encuentran en las superficies secas, en el esmalte exterior. Una lesión visible en una zona que sea húmeda puede llegar hasta la dentina; estos cambios se deben por los índices de refracciones relativos del esmalte, del aire y del agua; el esmalte por sí mismo tiene un índice de refracción de 1,62. En las superficies ya lesionadas, los poros contienen un medio acuoso con un índice de refracción de aproximadamente 1,33; esta diferencia hace que se vea afectada la dispersión de la luz, y hace que el daño tenga una apariencia opaca. (Ballesteros, 201, p. 14).

### Diagnóstico de caries dentales

La caries dental se puede describir como: “Una enfermedad infecto-contagiosa que presenta la desintegración progresiva de los tejidos calcificados de los dientes, producto de la acción metabólica de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables de la dieta”. (Carrillo, 2010, p. 14).

**Figura 5. Carie Dental**



Nota: Carrillo (2010).

La idea de todos los profesionales en odontología ha sido lograr obtener información sobre los métodos tradicionales de diagnóstico, como, por ejemplo, el examen visual, la detección con espejo, y explorar con o sin la asistencia de medios radiográficos, intentado, además, lograr mejorar la confiabilidad de la detección con el uso de medios de magnificación o de contraste. (Carrillo, 2010).

**Métodos visuo-táctiles.** la morfología de las caras oclusales es muy compleja, y sus superficies se han clasificado basándose, principalmente, en las diversas formas que presentan en su interior las foseas y fisuras. Es importante mencionar que existe una relación estrecha entre la morfología de las fisuras y las foseas, con la susceptibilidad a desarrollar caries, sobre todo en la influencia que pueden tener para la ubicación de la lesión inicial.

Carrillo (2010) menciona que:

El método tradicional de utilizar un explorador afilado para la detección de lesiones de caries ha permanecido esencialmente sin cambios por más de 60 años, pero recientemente ha sido objeto de controversias. Su valor como método de diagnóstico es muy pobre, y su uso indiscriminado, además de incrementar diagnósticos positivos falsos, puede causar mucho daño iatrogénico en la estructura de la lesión incipiente, impidiendo, como ya se ha mencionado, su posible remineralización. (p. 5).

Es de suma importancia la evaluación visual de la superficie del diente a examinar, pero la confiabilidad de este método, aun utilizando un explorador, es muy baja. La utilización de medios radiográficos, especialmente el empleo de radiografías, ha demostrado poder aumentar significativamente esta confiabilidad. (Kidd, 2005).

Carrillo (2010) dice que:

Hace ya algunos años se propuso el uso de soluciones de pigmentos como método de detección de dentina cariada. Uno de ellos, el más utilizado, fue la fucsina básica, un pigmento muy usado como solución reveladora para la detección de placa bacteriana. Esta técnica se basa en utilizar los pigmentos sobre la dentina al momento de efectuar la excavación de la lesión, para poder diferenciar la dentina infectada de la dentina no afectada. (p. 16).

**Figura 6. Dentina Teñida Para el Proceso de Evaluación**



Nota: Carrillo (2010).

**Métodos radiográficos.** el registro de la imagen de una estructura tridimensional, en una película, es un proceso difícil de evaluar. La sobre posición de estructura dental, como

el esmalte y la dentina, pero sobre todo las áreas oclusales tomadas lateralmente, en que existe la sobreposición del esmalte bucal y el esmalte lingual, así como de la unión esmalte-dentina sobre las fisuras y fosetas, hacen que la detección de lesiones oclusales por medios radiográficos sea muy difícil. (Carrillo, 2010, p. 17).

Es importante mencionar y considerar que existen muchos errores técnicos propios de la toma de radiografías de aleta de mordida, como la colocación de la película radiográfica en la boca, los movimientos inadvertidos que hacen los pacientes, el ángulo del rayo, errores del procesamiento de la radiografía y un sinnúmero de errores humanos. Aun así, las mejores tomas radiográficas interproximales no son un método confiable de detección de las caries oclusales; pueden ser utilizadas en forma más confiable y apropiada para la detección de caries proximales, pero no es un método acertado de diagnóstico de la profundidad y de la cantidad de estructura mineral perdida. (Kidd, 2003).

**Métodos de medición de resistencia eléctrica.** Estos métodos se basan en el principio de la disminución de resistencia en el esmalte y la dentina con caries, cuando estos se comparan con la resistencia que presentan estas estructuras sanas. Han demostrado ser superiores a los métodos radiográficos o de transiluminación, para la detección de lesiones de caries oclusal. (Carrillo, 2010, p. 17).

Las mediciones de conducción eléctrica en zonas donde hay presencia de caries, tienen un significado mayor, en comparación con las zonas libres de caries, principalmente en la diferenciación del esmalte sano y dentina cariada, pero, debido a la diversidad de la profundidad, al contenido mineral del esmalte dental y a la morfología de las superficies oclusales, se van a dificultar las lecturas correctas, donde se pueden confundir zonas de esmalte sanas con zonas de desmineralización. (Carrillo, 2010).

Métodos actuales.

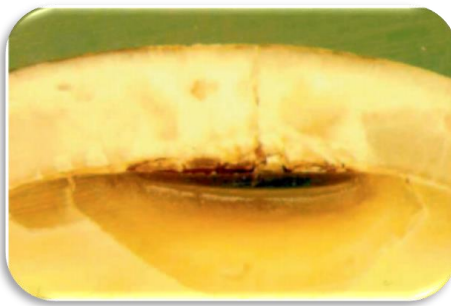
Según Carrillo (2010):

Aun cuando desde hace algunos años se han desarrollado métodos que puedan ayudar a efectuar un diagnóstico más preciso de caries, muchos de ellos presentan ciertas limitaciones que los hacen no muy confiables. Parte de estas limitaciones se debe a la dificultad para poder comparar el potencial o la habilidad de estos nuevos métodos con los

exámenes visuo-táctiles, para la detección de una desmineralización en etapa temprana, sobre todo en las áreas oclusales. (p. 17).

Además, es necesario que estos métodos de diagnóstico sean no invasivos, precisos y repetibles, principalmente después de aplicar protocolos de remineralización, prevención o de observación, y que permitan una más acertada predicción de la susceptibilidad de riesgo de caries. (Carrillo, 2010).

**Figura 7. Método Actual para el Diagnóstico de Caries (no invasivo)**



Nota: Carrillo (2010).

**Métodos ópticos.** los métodos ópticos de caries pueden ser considerados como los métodos naturales de elección para los profesionales en odontología, por su facilidad de detección de lesiones, y por su comparación, o por la complementación con los métodos visuo-táctiles. Estos métodos ópticos deben presentar las ventajas de facilitar los efectos de la detección con el ojo humano, permiten una mejor evaluación de la imagen y facilidad en el manejo de esta y, sobre todo, facilitan el almacenamiento y el acceso a la información registrada. (Carrillo, 2010).

Los métodos ópticos sobre los que más atención se ha puesto son: la dispersión de luz, la transiluminación por fibra-óptica y la fluorescencia por luz o láser. Al iluminar un diente y ser penetrado por la luz, puede suceder que esta sea absorbida por el órgano dentario,

o bien que se disperse. Estos dos procesos pueden ser alterados por los cambios en la estructura externa/interna del diente oclusal. (Carrillo, 2010, p. 18).

Actualmente, los métodos disponibles para el diagnóstico de las caries dentales presentan limitaciones y son confiables, ya que existe una leve penetración a la dentina. La práctica dental, que está basada en el manejo de las caries dentales, que se pretende hacer en un futuro no muy lejano, depende de obtener un método que no sea invasivo, preciso, repetible y con exactitud, para lograr detectar y diagnosticar lesiones de desmineralización. (Carrillo, 2010).

### **Placa bacteriana**

La placa bacteriana está constituida por un 70% de microorganismos, y el 30% restante, por elementos microbianos, como lo son la mucina salival, los residuos de comida, y las células descamadas de la cavidad bucal. La composición microbiana de la placa bacteriana es muy variada, y es modificada en función de la localización, el medio externo, la vida de la placa y la edad de la persona. Los microorganismos que forman la placa bacteriana son muy diversos, donde se encuentran de 200 hasta 300 especies. (Mosquera & Veloz, 2011).

La identificación de los microorganismos de la placa se basa en la parte del análisis de la morfología, tinción de Gram y análisis bioquímicos. De manera general, la placa bacteriana supragingival madura está conformada por: 50% cocos, 48% bacilos, 1% treponemas orales, y el 1% sobrante por otros microorganismos. (Mosquera & Veloz, 2011).

En la figura 8 se logran observar los microorganismos más importantes que están presentes en la placa bacteriana supragingival madura, la cual forma parte de la cavidad oral de las personas, junto con otro tipo de microorganismos.

**Figura 8. Microorganismos más Importantes Presentes en la Placa Bacteriana Supra Gingival Madura**

TIPO	COCOS	BACILOS	DIVERSOS MICROORGANISMOS
			<i>Mycoplasma spp</i> <i>Candida spp</i> <i>Trichomonas tenax</i> <i>Entamoeba gingivalis</i>
Gram (+) anaerobios facultativos	<i>Streptococcus spp</i> <i>Enterococcus spp</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Staphylococcus spp</i>	<i>Actinomyces spp.</i> ( <i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i> ) <i>Corynebacterium spp</i>	
Gram (+) anaerobios estrictos	<i>Peptostreptococcus spp</i>	<i>Eubacterium spp</i>	
Gram (-) preferentemente aerobios	<i>Neisseria spp.</i>		
Gram (-) anaerobios facultativos	<i>Veillonella spp</i>	<i>Haemophilus spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i> <i>Eikenella spp.</i>	
Gram (-) aerobios estrictos		<i>Fusobacterium spp.</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>Selenomonas spp</i>	

Nota: Suárez (s.f.).

### **Agentes antiplacas**

La manera más común de desinfectar las cavidades es mediante el uso de antisépticos, que son biocidas, ya que deshacen o impiden el crecimiento de los microorganismos sobre los tejidos vivos. (Ballester, 2014, p. 11). Se definen como agentes inhibitorios con mayor eficacia aquellos donde la acción se mantiene en el área de la boca, durante el mayor tiempo posible. (Bascones, Morante & Pérez, 2006).

Según Bascones et al. (2006), los agentes químicos para el control de la placa deben reunir los siguientes requisitos:

**Especificidad:** el control de placa no debe basarse en antibióticos, siendo reservados para uso sistémico en infecciones dentales o enfermedades sistémicas específicas. (párr. 6).

**Eficacia:** la pauta terapéutica viene determinada por la concentración mínima inhibitoria para las bacterias asociadas a patologías dentales. Al aceptar la naturaleza no específica de la placa dental, las características antimicrobianas de los antisépticos bucales hacen que sean los fármacos de elección. (párr. 7).

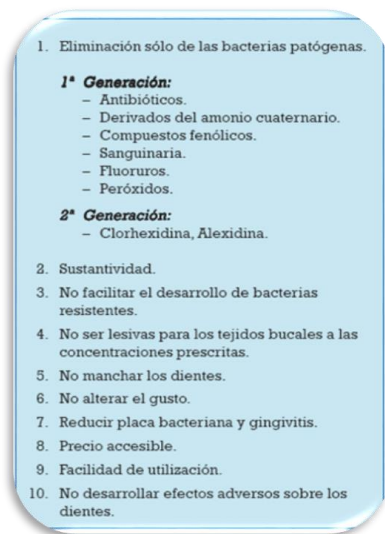
**Sustantividad:** cualidad que mide el tiempo de contacto entre una sustancia y un sustrato en un medio dado. Al tratar infecciones dentales, esta es una cualidad muy importante, ya que el agente antimicrobiano necesita cierto tiempo de contacto con el microorganismo para inhibirlo o eliminarlo, a diferencia de las infecciones sistémicas, en las que el tiempo de contacto deseado puede obtenerse mediante aplicaciones periódicas parenterales o enterales del fármaco. (párr. 8).

**Seguridad:** los agentes antimicrobianos se han ensayado extensamente, por lo que su uso está avalado científicamente. La seguridad de unos fármacos viene condicionada por su:

- **Permeabilidad:** se deben absorber en el tracto intestinal, y pasar después al torrente sanguíneo. La permeabilidad de la membrana es una característica importante de los agentes de peso molecular relativamente alto, como la clorhexidina y la sanguinaria, que se absorben mal y su toxicidad es baja.

- Potencial de toxicidad: debe ser bajo. Los compuestos más tóxicos son las soluciones de fluoruros en concentraciones de 0,2 al 2%, siendo los menos tóxicos los antibióticos, como las tetraciclinas. (párr.9)
- Eficacia intrínseca: es el porcentaje de efecto máximo que puede conseguirse con las limitaciones de solubilidad del agente. No todos los agentes utilizados son capaces de conseguir, por enjuagues, una supresión completa del crecimiento bacteriano. (párr. 10).

**Figura 9. Propiedades Ideales de los Agentes Antiplacas**



Nota: Bacones & Morante (2006).

### **Sustancias utilizadas para placa dental**

Según Bascones *et al.* (2006):

El control de la placa bacteriana es el principal método en lo que son las enfermedades periodontales. Día con día está más extendido el control químico de la placa, de manera complementaria a un control mecánico ineficaz. Las sustancias químicas actúan sobre la placa bacteriana por los medios siguientes:

- 1- Evitando la adherencia bacteriana, con agentes antiadhesivos. Las sustancias antiputrefacción o los hipocloritos son antiadhesivos, pero son tóxicos en el medio oral. No hay compuestos hoy en día con estas características.
- 2- Deteniendo o retrasando la proliferación bacteriana con antimicrobianos.
- 3- Eliminando la placa establecida con lo que a veces es llamado el "cepillo dental químico".
- 4- Alterando la formación de la placa. Esto no se ha intentado, dada la incompleta comprensión de la etiología bacteriana de la gingivitis. (pp. 101-102).

#### **Compuestos de amonio cuaternario**

Los compuestos cuaternarios reducen la placa bacteriana en un 35%; su mecanismo de acción puede deberse al aumento de la permeabilidad de la pared bacteriana, favoreciendo la lisis o rompimiento de esta pared, y disminuyendo la capacidad de la bacteria, para así adherirse a la superficie dentaria. Estos compuestos son de eficacia moderada, y se eliminan muy rápidamente de la superficie bucal. (Bascones *et al.*, 2006).

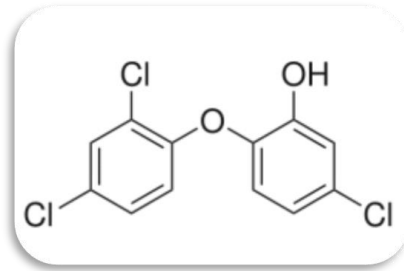
Bascones *et al.* (2006) manifiestan que:

Los efectos colaterales indeseables que tienen son la tinción y sensación de quemazón en la mucosa bucal y lesiones ulcerosas, principalmente el cloruro de cetilpiridinio (CPC), que generalmente se usa en pastas dentífricas y colutorios al 0,5%. De acuerdo con los estudios de Harper y cols., en 1995, al comparar una serie de productos comerciales franceses, entre los que se encontraba uno cuyo compuesto era CPC al 0,5% (Alodont<sup>®</sup>), con otros, encontraron que el CPC era el tercero que producía un menor descenso de carga bacteriana en saliva, siendo significativamente inferior a otros compuestos de clorhexidina y hexetidina.

#### **Triclosán**

El triclosán presenta actividad antibacteriana, por la capacidad de afectar el mecanismo de nutrición bacteriana, y así perturbar la membrana plasmática; esto se da por la inhibición de la proteína transportadora enoil-acil reductasa que regula la biosíntesis de los lípidos de la membrana celular. (García, Sánchez, Galindo & Cristerna, 2016).

**Figura 10. Estructura elemental del Triclosán**



Nota: Molina (2014).

La exposición al triclosán sucede a través del contacto con productos de belleza, de limpieza del hogar o por productos de higiene personal, como pastas dentales, enjuagues bucales, jabones y desodorantes. Se calcula que entre 1992 y 1999 había aproximadamente 700 productos con triclosán en el mercado norteamericano. Al usar estos productos, el componente es absorbido por la piel, por mucosas, y algunas veces por ingestión; una vez absorbido, el triclosán tiene una distribución en el sistema y es detectable en plasma, orina e incluso leche materna. (Schweizer, 2001).

Bascones *et al.* (2006) mencionan:

El triclosán como colutorio al 0,2% tiene un efecto inhibitorio moderado de la placa y una sustantividad antimicrobiana de alrededor de cinco horas. Su acción se ve reforzada por el agregado de citrato de zinc, o por el copolímero éter polivinilmetacrílico del ácido maleico. Se demostró que los efectos sobre el control de placa, en un grupo de pacientes que dejaban de cepillarse durante cuatro días, era ligeramente mejor con un enjuague con una dilución de pasta de dientes con NaF + 2% de éter de polivinilo + 0,3% de triclosán en 10 ml de agua que con un control de solución salina ( $2,26 \pm 0,49$  Vs  $2,55 \pm 0,54$ ). Una solución de clorhexidina al 0,12% obtuvo unos valores de  $1,63 \pm 0,49$ . (párr. 24).

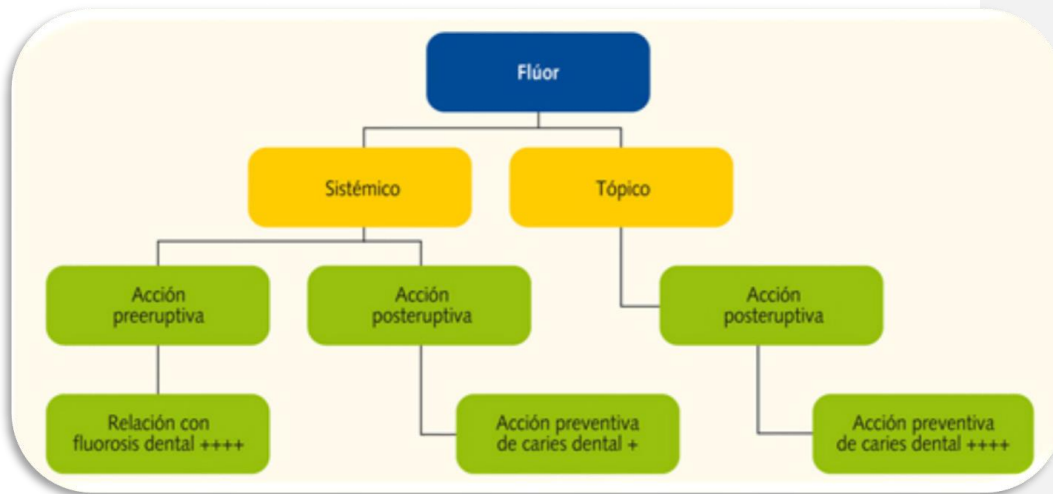
### **Fluoruros**

Los fluoruros presentan actividad antiplaca. Los que más se utilizan a nivel local son: fluoruros de estaño ( $\text{SnF}_2$ ), fluoruros de sodio (NaF), y fluoruro fosfato acidulado. Se dice que el mecanismo de acción del fluoruro de estaño es la alteración de la agregación bacteriana y de su metabolismo: este se encuentra indicado principalmente en el control de las caries; generalmente se administra en forma de pasta dentífrica; su efecto a la hora de prevenir la formación de la nueva placa dental, usándolo como colutorio, es similar al triclosán. (Bascones *et al.*, 2006).

Según Acuña (2013, p. 12), el flúor tiene propiedades antiplaca en cantidades óptimas. Si bien aún no se conoce con certeza el mecanismo de acción frente a la caries, se ha indicado que:

1. Favorece la remineralización: en el exterior de los cristales parcialmente desmineralizados ejerce una función como núcleo para el proceso de remineralización dental.
2. Inhibe la desmineralización: los nuevos cristales presentan flúor, incorporado directamente, de un tamaño mayor, lo que permite una disminución de los poros del esmalte, lo cual desfavorece la difusión del ácido.
3. Reduce el potencial cariogénico de la placa dental: perjudica el metabolismo de los microorganismos, como el *Streptococcus mutans*, inhibiendo la enzima enolasa, la cual participa en la captación de azúcares y en el desarrollo bacteriano.

**Figura 11. Tipos de Administración de Flúor y Acción Preventiva**



Nota: Miñana (2011).

Miñana (2011) hace una explicación sobre el efecto sistema y tópico del flúor:

**Efecto sistémico.**

- **Preeruptivo.** Tras su absorción intestinal y su paso a la sangre, el flúor se incorpora a la estructura mineralizada de los dientes en desarrollo, y probablemente incrementa levemente la resistencia a la desmineralización frente a la acción de ácidos orgánicos, ya que solamente un 8-10% de los cristales del esmalte están compuestos por FAP en niños residentes en zonas con agua fluorada.

Al principio de la investigación sobre el flúor, este se creía que era el efecto más importante. Por ello se recomendaba dárselo a la embarazada, así como antes de los seis meses de vida (antes de la erupción del primer diente), y se aconsejaba retirar los suplementos tras la erupción de la segunda dentición, pues no tendría sentido su administración tras el desarrollo dental.

- **Posteruptivo.** Tras la erupción dental, el flúor sistémico sigue estando poco implicado en la formación de la estructura orgánica dental. Tan solo la fracción excretada por saliva tendría una acción significativa protectora de la caries dental. (párr. 15).

### **Efecto local**

El flúor, presente en la fase fluida de la superficie dental, es el que realmente disminuye la desmineralización y aumenta la remineralización del esmalte, siendo clave la frecuencia de la exposición a él. Este efecto posteruptivo tópico es el que se cree más adecuado para prevenir la caries dental.

La saliva es el principal transportador del flúor tópico. La concentración de flúor en el ductus salivar, tras la secreción de las glándulas salivares, es bajo (0,016 ppm en zonas con agua fluorada y 0,0006 ppm en áreas con agua no fluorada). Esta concentración probablemente tenga una débil actividad cariostática. Sin embargo, la pasta dentífrica o los geles logran una concentración en la boca 100 a 1000 veces superior.

Así pues, con esta perspectiva, y a diferencia de lo que se creía inicialmente, se debe:

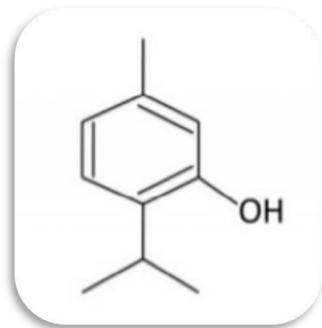
- Hacer más hincapié en los distintos medios de administración tópica del flúor.
- Recomendar el flúor tópico toda la vida, y no solo restringir las recomendaciones a la época del desarrollo y erupción dental.
- Desaconsejar el empleo de excesivo flúor sistémico, sobre todo antes de la erupción dental (en la embarazada y antes de los seis meses de vida).
- Insistir en el papel remineralizador de dosis bajas de flúor, administradas de forma continua. (párr. 16).

### Fenoles y Aceites esenciales

Bascones et al. (2006) mencionan la importancia de los fenoles y de los aceites esenciales para tratar las caries dentales:

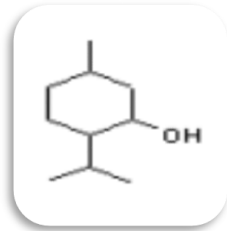
Han demostrado una reducción de la placa y gingivitis en un 35%. Se han usado en colutorios y caramelos durante años. El más conocido es el Listerine®, un aceite esencial mezcla de timol, mentol y eucalipto, combinados con metilsalicilato con un 26,9% de alcohol y con una presentación en diferentes sabores. Las indicaciones del fabricante son las de utilizarlo como enjuague diario, para ayudar al control de la placa bacteriana. Este producto se debe usar en un enjuague de 20 ml durante 60 segundos dos veces al día, ya que se obtiene una reducción del índice de placa, de un 12% mayor, utilizándolo 60 seg. en vez de 30 seg. (párr. 24).

**Figura 12. Estructura Química del Timol**



Nota: López & Malo (2000).

**Figura 13. Fórmula Estructural del Mentol**



Nota: Negrete (2012).

Su efecto bactericida ha quedado probado recientemente por Charles y cols., en el 2000, al realizar un recuento de las bacterias vivas en saliva, tras hacer un enjuague con una solución acuosa, y a la media hora un enjuague de 30 seg. con Listerine® o con un control tras 24 horas de ausencia de higiene, encontrando que el 78,7% de las bacterias estaban muertas tras realizar un enjuague con Listerine® y un 27,9% con el control. Al realizar este mismo experimento *in vitro*, los resultados se correlacionan con los obtenidos *in vivo*. (Charles, Pan, Sturdivant & Vincent, 2000).

Dentro de los efectos adversos encontrados, se puede mencionar un fuerte sabor, donde la casa comercial justifica que, al ser un producto norteamericano, es más fuerte, ya que a los estadounidenses les gustan los sabores fuertes, y de acuerdo con Ponefract, en el 2001, tiene un ligero poder erosivo sobre el esmalte. Otros efectos adversos conocidos son: la tinción, el sabor amargo, y la sensación de quemazón en la cavidad oral. (Bascones *et al.*, 2006).

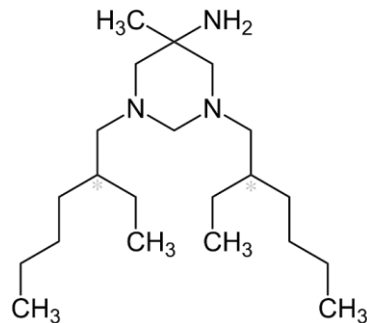
### **Hexetidina**

Bascones *et al.* (2006) indican:

La hexetidina es un derivado de pirimidina, al que se le atribuyen propiedades antisépticas, así como la de acelerar la cicatrización postcirugía periodontal. La hexetidina tiene una acción inhibitoria limitada de la placa. Su acción antiplaca se reforzaría con las sales de zinc. Su sustantividad es de 1-3 horas. Al estudiar su efectividad en la curación de úlceras aftosas, no se encontró ningún beneficio sobre una higiene oral convencional.

Además, la hexetidina en concentraciones mayores del 0,1% puede producir úlceras orales. (párr. 34).

**Figura 14. Estructura Química de la Hexetidina**



Nota: Rojas, Santos (2005).

Rojas & Santos (2005) mencionan:

La Hexetidina es un fármaco antiséptico y antifúngico. La concentración más utilizada es del 0,10% como colutorio en el tratamiento de infecciones locales y como complemento de la higiene oral. Además, su uso puede estar indicado como coadyuvante local en el tratamiento de infecciones orofaríngeas. Ha demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas, tanto *in vitro* como *in vivo*. La hexetidina presenta un amplio espectro de actividad frente a microorganismos Gram+ y Gram-, así como frente a determinados hongos. La hexetidina posee capacidad de ser retenida en la placa dental y en las membranas mucosas. (p. 450).

Cuando se comparó el efecto antibacteriano en saliva, tras un enjuague de Hextril (hexetidina al 0,2%), con cuatro marcas de clorhexidina, una de CPC y un control, se observó que todos los enjuagues producían una disminución de los recuentos bacterianos a los 30 min, siendo los resultados mejores para Hextril que para el control, Eludril (clorhexidina 0,1%) y Alodont (CPC 0,005%), pero a las cinco y siete horas, Hextril obtenía los mismos resultados que la solución de CPC y la clorhexidina al 0,1%, siendo los resultados significativamente peores que con las otras clorhexidinas (Hibident, Paroex, Prexidine). En cuanto al acúmulo de placa, hexetidina obtuvo unos resultados ligeramente peores que las

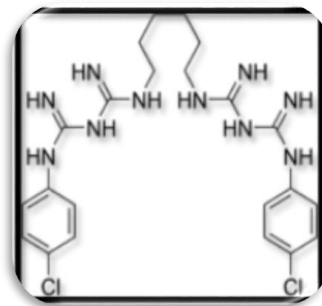
clorhexidinas más efectivas, y mejores que el compuesto de CPC y Eludril. (Bascones *et al.* 2006).

La hexetidina no produce alteraciones importantes en la flora oral autóctona, ni permite un crecimiento bacteriano patógeno. Por lo tanto, su uso diario elimina bacterias patógenas, manteniendo las no-patógenas con función protectora de la flora normal. Esta posee capacidad de ser retenida en la placa dental y membranas mucosas. Estudios iniciales propusieron que la hexetidina era eficaz en el control de la gingivitis asociada a la placa. (Rojas & Santos, 2005. p. 450).

### Clorhexidina

La clorhexidina presenta gran afinidad por las superficies dentarias y tisulares; esta sirve como depósito, incluso después del enjuague o la irrigación con el agente. Debido a su alta efectividad, se considera el mejor antiséptico en el mercado. Otros estudios clínicos han demostrado, claramente, que los enjuagues hechos con clorhexidina al 0,12% presentan excelentes perfiles de seguridad, eficacia y tolerancia. (Rojas & Santos, 2005).

**Figura 15. Estructura Química de la Clorhexidina**



Nota: Aguirre (2013).

Se han realizado ensayos controlados durante periodos de seis meses o más, y en estos estudios se ha demostrado que la reducción de la placa se situó entre el 16% y el 45%, y hubo

una reducción de la gingivitis entre el 27 y el 80%. Es importante mencionar que la duración de un estudio fue de hasta 24 meses, y no se detectó ninguna resistencia bacteriana a la clorhexidina. (Rojas & Santos, 2005).

Bascones *et al.* (2006) dicen:

La clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra, por científicos en un estudio contra la malaria. En ese momento, los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibisguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano, y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel; posteriormente, comenzó a usarse en medicina y cirugía, tanto para el paciente como para el cirujano. En odontología se utilizó inicialmente para desinfección de la boca y endodoncia. (p. 106).

**Mecanismo de acción.** Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3,5, con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno; es esta naturaleza dicatiónica la que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en forma de sal, y la preparación más común es la sal de digluconato, por su alta solubilidad en agua. (Bascones *et al.*, 2006).

La clorhexidina absorbida es liberada gradualmente en un rango de 8 a 12 horas en su forma activa; después de 24 horas todavía se pueden recuperar concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese periodo. Su pH óptimo oscila entre 5,5 y 7; cuando hay un pH entre 5,0 y 8,0 es activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. (Bascones *et al.*, 2006).

**Farmacocinética.** aproximadamente el 30% del principio activo es retenido en la cavidad oral, después de realizar el enjuague. La clorhexidina retenida es liberada lentamente en los fluidos orales. Se realizaron estudios en animales y en humanos, y se logró demostrar la poca absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal. La excreción de clorhexidina se realiza principalmente por las heces (90%), y menos del 1% se excreta por la orina. (Bascones *et al.*, 2006).

**Concentraciones:** la clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0,12% y al 0,2%. Es recomendable utilizar un buche con el 10%, a una concentración del 0,2% y de 15 ml al 0,12%; esto se debe a la dosis total de clorhexidina, ya que 10 ml al 0,2% liberan 20 mg, y 15 ml al 0,12% liberan 18 mg, donde se logra observar que los resultados en ambas formulaciones son igual de efectivos.

El propósito de las últimas investigaciones es conseguir una formulación de clorhexidina en un medio no alcohólico, igual de efectiva que la formulación de la misma en solución alcohólica. (Bascones et al. 2006). Según el estudio de Van Steenberghe y cols., (2001), se consigue con una combinación de clorhexidina al 0,12% sin alcohol, a la que se añade cetilpiridinio al 0,5% (nueva formulación de Perio Aid), resultando igual de efectiva, en el control de la formación de nueva placa, que clorhexidina con alcohol al 0,12% (Perio Aid), y que clorhexidina con alcohol al 0,2% (Corsodyl).

Conclusiones similares reflejan el estudio de Borrajo y cols. (2002), donde se comparan dos formulaciones de clorhexidina, una en medio alcohólico con digluconato de clorhexidina al 0,12%, con fluoruro sódico al 0,05% y etanol al 11%, frente a una formulación idéntica sin alcohol. Los resultados indican la misma efectividad para ambas formulaciones, en control de placa y reducción de la inflamación gingival.

**Espectro antibacteriano:** de manera *in vitro* presenta efectividad frente a Gram negativo y Gram positivo, incluyendo los microorganismos aerobios y anaerobios, e incluso los hongos y las levaduras. (Bascones *et al.*, 2006).

Bascones *et al.* (2006) mencionan que:

La función de la pared celular es una capa externa rígida que protege la membrana celular. La adsorción de clorhexidina va a causar una alteración en la movilidad electroforética de todo el microorganismo. Cuando clorhexidina se pone en contacto con la membrana celular, su integridad se altera, y se facilita la liberación de los componentes intracelulares. A bajas concentraciones, se liberan las sustancias de bajo peso molecular, como iones potasio y fósforo. A altas concentraciones se presenta una precipitación del contenido citoplasmático. Así, clorhexidina puede ejercer una acción bacteriostática, que

llega a ser letal cuando la concentración se eleva, al causar precipitación citoplasmática o coagulación. (p. 108).

**Toxicidad y efectos secundarios:** no se ha observado resistencia bacteriana, ni en los casos de uso prolongado en boca, ni hubo evidencias de sobreinfección por hongos, levaduras o virus. El uso prolongado en boca produce un leve desplazamiento de la flora hacia microorganismos menos sensibles, pero se revirtió rápidamente a la situación inicial al término del estudio de dos años. (Bascones *et al.* 2006).

**Figura 16. Alcohol y pH de distintos**

<b>TABLA VI.- ALCOHOL Y PH DE DISTINTOS COLUTORIOS*. VALORES PROMEDIOS</b>		
	<b>Alcohol (%)</b>	<b>pH</b>
Bexident Encias®	0	6,25
Corsodyl® §	7,0	6,00
Corsodyl menta®	7,0	6,25
Peridex®	11,6	5,60
Perio-Aid®	11,6	6,50
Cariax®		6,65
Listerine®	26,9	4,20
Listerine Cool Mint®	22,0	4,20
Periogard®	11,5	4,50
Cepacol® 1	14,0	6,00
Scope® II	18,5	5,50
Oraldine®	10,0	3,90
Enjilácer®	15,7	4,00

Nota: Bascones *et al.* (2006).

## **Plantas Medicinales**

### **Generalidades de las plantas medicinales**

Las plantas y los árboles son de suma importancia para la medicina moderna. Desde hace mucho tiempo, los remedios naturales y las plantas medicinales fueron y han sido el principal, y se puede decir que el único recurso del cual disponía el médico para tratar a los pacientes; todas las culturas a lo largo del planeta han usado y usan hoy en día las plantas medicinales como base de su propia medicina. (Lázara & Rodríguez 2008).

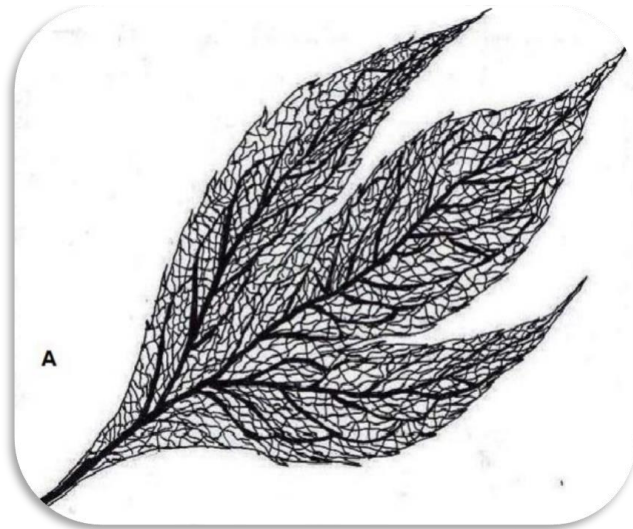
Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, para el organismo vivo. Las sustancias activas son productos del metabolismo secundario de las plantas; no se encuentran en estado puro en las mismas, sino en forma de complejos, cuyos componentes se complementan y se ven reforzados en su acción sobre el organismo. (Quesada, 2008).

### **Neurolaena lobata (gavilana)**

La *Neurolaena lobata* es un arbusto que puede alcanzar hasta los cuatros metros de altura, con hojas alargadas que miden aproximadamente de 5 a 24 cm. Esta planta es originaria de los trópicos, y se puede encontrar principalmente en el Caribe y en América Central. Dependiendo del país se le llama de diferentes maneras; por ejemplo; en Costa Rica se le llama “gavilana”, en Antigua y Barbados “burro amargo”, en Cuba “salvia” y en Honduras es llamada “mano de lagarto”. (García *et al.*, 2007).

Es una hierba que pertenece a la familia de Asteraceae; presenta actividad antimalárica. De acuerdo con algunos estudios publicados, esta presenta sesquiterpenlactonas, que logran combatir la forma asexual del *Plasmodium falciparum*, uno de los parásitos encargados de producir la malaria. (Dieseldorff, 2007).

**Figura 17. Hoja adulta de *Neurolaena lobata***



Nota: Dieseldorff (2007).

**Tabla 2. Taxonomía *Neurolaena lobata***

<b>Familia</b>	<b>Asteraceae</b>
<b>Género</b>	<i>Neurolaena</i>
<b>Especie</b>	<i>Lobata</i>
<b>Autor</b>	(L. ) R. Br.
<b>Testigo</b>	Grayum 2675, DUKE, LSCR
<b>Nombre Común</b>	Capitana (CR), Gavilana (LS), Gavilana (CR)

Fuente: La Selva. "Florura digital" (s.f.).

Distribución: de México a Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Las Antillas. En Costa Rica: bosque húmedo, muy húmedo, pluvial y seco, 0-1800 m, vertiente Caribe, Cordillera Central, de Guanacaste, Talamanca y Tilarán, Llanura de Los Guatusos, San Carlos y Tortuguero, Baja Talamanca; Vertiente Pacífica, cordilleras de Guanacaste, Talamanca y Tilarán, Valle Central, Pacífico Central, Península de Osa y Nicoya. (La Selva. “Florura digital”, s.f.).

**Tabla 3. Descripción botánica de la gavihana**

<b>Hábito</b>	<b>Hierba o arbusto, de 1.5-3 m</b>
<b>Hojas</b>	Hojas simples, alternas, de 2-30 x 0.3-12 cm, elípticas a generalmente 3-lobuladas, márgenes dentados, pecíolos casi indiferenciados.
<b>Flores</b>	Capítulos discoides, con pedúnculos de 0.3-1.2 cm; brácteas involucrales internas de hasta 0.7 cm; receptáculo cónico, de hasta 1.5 mm. Flósculos 30, de 0.4-0.5 cm, amarillos.
<b>Frutos</b>	Cipselas de 2-4 mm, esparcidamente pubescentes; vilano de 4-5 mm.
<b>Diagnóstico</b>	Se reconoce por su hábito arbustivo; hojas simples, alternas, con las venas pinnadas, los márgenes dentados y los pecíolos casi indiferenciados, extremadamente amargas al paladar (especialmente frescas); por sus capítulos discoides, con los flósculos amarillos; y las cipselas con los carpóforos bien desarrollados, con el vilano compuesto por numerosas cerdas capilares uni- o biseriadas.

Nota: Elaboración propia (2020).

### Usos tradicionales de la gabilana

La *Neurolaena lobata* es una hierba popular de la familia Asteraceae, que es utilizada en Trinidad y Tobago y en el Caribe para combatir varias enfermedades, como la gripe. Las hojas las usan para hacer un té; su sabor es sumamente amargo. Las hojas de *Neurolaena lobata* contienen un potente agente antiparasitario, llamado sesquiterpeno dialdehído, que es muy efectivo contra los parásitos intestinales, cándida e infecciones por hongos. También es utilizada para controlar la diabetes, curar heridas e infecciones. (Shivananda *et al.*, 2014).

Investigaciones previas sobre el extracto de la hoja de *Neurolaena lobata* demostraron su actividad antiulcerogénica, antinociceptiva, antiparasitaria y antiviral. Además, estos autores, en su artículo, descubrieron que el extracto de la hoja de la planta ejerce una potente actividad antiinflamatoria, en una prueba que realizaron de edema de pata de ratón, inducida por carragenina (Lajter *et al.*, 2014).

McKinnon *et al.* (2014) dicen:

Se sugirió que la actividad analgésica era a causa de la interferencia con el proceso inflamatorio. En cuanto a la caracterización farmacológica y fitoquímica de la planta, se les atribuyó los diferentes efectos terapéuticos a las lactonas sesquiterpénicas, que se identificaron como componentes principales. Las lactonas de sesquiterpeno son metabolitos secundarios, que confieren potentes propiedades antiinflamatorias a plantas medicinales como *Árnica montana*, *Artemisia absinthium* y *Tanacetum parthenium*. (p. 1696).

## **Familia Asteraceae**

Las plantas que integran esta familia son un grupo altamente heterogéneo respecto a la morfología de sus partes vegetativas (raíces, tallos, hojas, indumento y otras), ya que presentan casi todos los tipos de formas, disposición y arreglo; en cambio, son conspicuamente homogéneas en cuanto a la morfología de la inflorescencia que las hace verdaderamente inconfundibles, y se presentan como una cabezuela o capítulo (estructura altamente especializada). (Tapia, 2010).

Con funciones de atracción de los vectores de polinización, que generalmente es entomógama, aparenta ser una sola flor si se le mira superficialmente, pero vista en detalle, resulta estar compuesta de decenas, o incluso centenares de flores diminutas, insertadas en una base carnosa (receptáculo), donde los “pétalos” que rodean la cabezuela son flores zigomorfas, pentámeras, con una porción inferior tubular, y uno de los lóbulos prolongado de forma cintiforme llamada lígula. Estas flores, por lo general, son funcionalmente unisexuales o estériles, y las flores del centro, o disco, son actinomorfas, tubulares coronadas por 5 lóbulos, y son hermafroditas (el ejemplo típico es el “girasol”, *Helianthus annuus L.*). (Tapia, 2010, p. 82).

Tapia (2010) menciona que:

La familia Asteraceae es uno de los grupos de plantas vasculares más grande que hay; se estima que a nivel mundial existen alrededor de 1535 géneros y de 23000 a 32000 especies. Para México, se reportan alrededor de 362 géneros y 3351 especies, y en la Península de Yucatán se estima que existen 79 géneros y 142 especies, siendo una de las cinco más diversas en el área, junto con las Fabaceae, Poaceae, Orchidaceae y Euphorbiaceae. (p. 83).

## **Metabolitos Secundarios**

Una de las características de los seres vivos es la presencia de la actividad metabólica. El metabolismo no es nada más que el conjunto de reacciones químicas que ocurren en el interior de las células. En el caso de las células vegetales, el metabolismo acostumbra a ser dividido en primario y secundario. (Quispillo, 2013).

Se entiende por metabolismo primario al conjunto de procesos metabólicos que desempeñan una función esencial en el vegetal, tales como la fotosíntesis, la respiración y el transporte de solutos. Los compuestos involucrados en el metabolismo primario poseen una distribución universal en las plantas. (Quispillo, 2013, p. 15).

Quispillo (2013) hace relación a los metabolitos secundarios, mencionando que de estos:

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas está comprendido dentro de los llamados Productos naturales o Metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, y de distribución más restringida y más característica de fuentes botánicas específicas, que los llamados metabolitos primarios; estos están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente. De los primeros, Productos naturales o Metabolitos secundarios, se puede decir que son indispensables en las plantas que ocurren; no intervienen o quizás, mejor dicho, no se ha descubierto aun una función metabólica, en la cual ellos intervienen; son considerados artículos de lujo en la planta. (p. 3).

### **Alcaloides**

Los alcaloides constituyen uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en los organismos vivos. Estos han sido aislados tradicionalmente de las plantas, de las cuales alrededor del 20% los contienen. (Luca & Pierre, 2000). Actualmente, se ha reportado la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos. Una gran cantidad de alcaloides han sido empleados en la medicina, y muchos de ellos hoy en día son fármacos. (Schmeller & Wink, 1998).

Loyola, Sánchez, Canto-Canché, Gutiérrez, Galaz & Moreno (2004) dicen:

En el grupo de sustancias químicas conocidas como alcaloides, alrededor de unas 12.000, se agrupan en una gran variedad de constituyentes químicos, por lo que estos metabolitos se han estructurado de acuerdo con su origen biogénico. Con base en esta clasificación, se tienen cuatro grupos: 1) alcaloides derivados de aminoácidos, tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico; 2) alcaloides purínicos; 3) terpenos aminados y 4) alcaloides policétidos. (párr. 4).

Arango (2008, p. 6) menciona las características principales de los alcaloides:

- Sirven como productos de almacenamiento o desecho del nitrógeno sobrante; esta función es similar a la del ácido úrico o de la urea en los animales.

- Los alcaloides son asociados con ácidos orgánicos, que permiten facilitar el transporte en la planta.

- A nivel microquímico se ha logrado mostrar, en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta; por ejemplo, en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja, permitiendo tener la idea de que los alcaloides cumplen una importante función como protectores de la planta, en la mayoría de veces teniendo un sabor amargo, como escudo del ataque de insectos.

- Los alcaloides pueden servir de reguladores en el proceso del crecimiento de las plantas.

Las técnicas de identificación de los alcaloides se basan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), cuando se combinan con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, donde se forman precipitados. En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como Wagner, Mayer, Hager, Ehrlich, Dragendorff, entre otros. (García, 2018).

Si en la planta hay presencia de alcaloides, se formará un precipitado anaranjado, el cual se observa en el momento en que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución. (Alpizar, 2018).

### **Flavonoides**

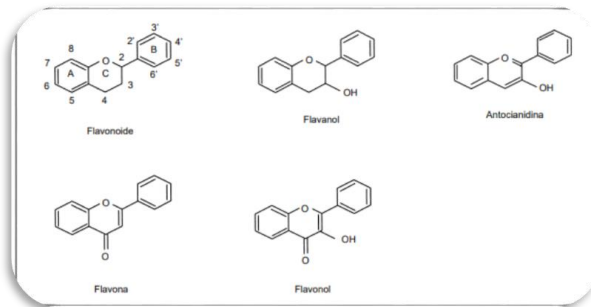
Los flavonoides son compuestos fenólicos, que constituyen de la parte no energética de la dieta humana. Se pueden encontrar en vegetales, semillas, frutas y bebidas, como el vino y la cerveza. Se han logrado encontrar más de 5000 flavonoides diferentes. Estos han sido considerados sustancias sin acción benéfica para la salud humana, pero después de varios estudios han demostrado muchos efectos positivos, debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. (Martínez, González, Culebras & Tuñón, 2002).

Según Martínez *et al.* (2002):

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950. (p. 271).

Estos metabolitos secundarios contienen, en su estructura química, un número muy variable de grupos hidroxilos fenólicos, y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, que les confieren una capacidad antioxidante; por esta razón desempeñan un papel importante en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efecto terapéutico en una gran cantidad de patologías, incluyendo las cardiopatías isquémicas, la arterosclerosis o el cáncer. (Martínez *et al.*, 2002).

**Figura 18. Flavonoides. Estructura Básica y Tipos**







Nota: Martínez *et al.* (2002).

Las flavonas, flavonoles y auronas, por su sistema conjugado, se caracterizan como compuestos sólidos, con colores desde amarillo muy leve hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores más intensos como el rojo, morado, violeta y azul. La solubilidad se ve por la forma en que se encuentran sus sustituyentes presentes. Tanto los glicósidos, las antocianidinas, como los sulfatos en agua y alcohol, se consideran solubles. Las agliconas flavonoides hidroxiladas son solubles en etanol, metanol y n-butanol, y aquellas menos hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas metoxiladas son solubles en solventes menos polares, como el cloroformo. (Colina, 2016, p. 22).

La identificación de los flavonoides se realiza mientras se hace la prueba de Shinoda, donde es considerada positiva si presenta una coloración del rojo oscuro; puede haber una variación en el color, mostrando un rosado claro, en caso que la presencia de flavonoides no sea tan alta. Según Soto (2015, p. 16), se permite reconocer la presencia de los metabolitos cuando el ensayo se colorea de amarillo, anaranjado, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

**Figura 19. Clasificación de los Flavonoides**

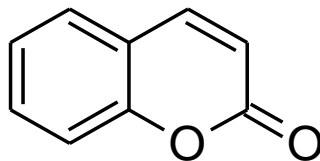
Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

Nota: Escamilla, Cuevas & Guevara (2009).

### Cumarinas

Las cumarinas son una gran clase de lactonas, ya sean de origen natural o sintético, las cuales están constituidas por un anillo de benceno condensado a un anillo  $\alpha$ -pirona, y esencialmente poseen un sistema  $\pi$ - $\pi$  conjugado rico en electrones, que presentan buenas propiedades de transporte de carga. (Pinto, 2013).

**Figura 20. Estructura Química de la Cumarina**



Nota: Elaboración propia (2020).

En la naturaleza, las cumarinas pueden ser encontradas en raíces, hojas, flores o frutos de diferentes familias de las *Angiospermas*, como, por ejemplo, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Umbelliferae*, entre otras. Las cumarinas son generalmente solubles en alcohol y disolventes orgánicos; estas son lactonas y, como tales, en un medio alcalino sufren hidrólisis, con formación de sales y solubilización de la misma. (Pinto, 2013).

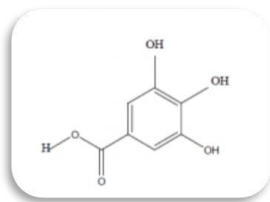
La diversidad estructural de los compuestos derivados de las cumarinas permite su clasificación en cumarinas simples, o bien en cumarinas más complejas, en general condensadas con otros heterociclos: furocumarinas, piranocumarinas, biscumarinas, cumarinolignanos y triscumarinas. (Pinto, 2013, p. 28).

Las cumarinas son compuestos derivados de la  $\alpha$ -benzopirona. Dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o azul-verdosa en la cámara UV, que se aprovecha para su detección. Este tipo de compuestos pueden ser revelados usando una solución de KOH. (García *et al.*, 2009).

### Taninos

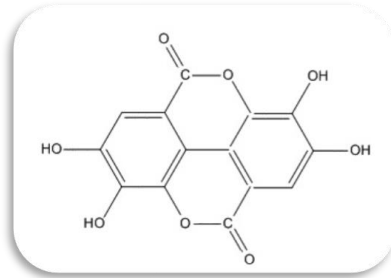
Los taninos son sustancias fenólicas, resultado de la combinación de una molécula de azúcar, generalmente glucosa, con un número variable de moléculas de ácidos fenólicos, ácido gálico o su dímero, el ácido elágico, y que además tiene la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y esteroides. Además, estos presentan efectos benéficos para la salud, ya que tienen propiedades astringentes, antiinflamatorias, cicatrizantes, antioxidantes y antibacterianas; también, la presencia de taninos catéquicos se indica con una coloración verde en la prueba, y una azul para los taninos gálicos. (Velásquez, s.f.).

**Figura 21. Estructura química del ácido gálico**



Nota: García, Fernández & Fuentes (2015).

**Figura 22. Estructura química del ácido elágico**



Nota: Ascacio, Aguilera, Rodríguez & Aguilar (2013).

Avello (2016) menciona que los taninos se distinguen en los siguientes grupos:

- Taninos hidrolizables: son poliésteres compuestos por ácidos orgánicos y un azúcar o un polialcohol, cuya denominación se debe a que, al ser tratados con ácidos diluidos, estos son capaces de generar un rompimiento hidrolítico. Su azúcar principal es la glucosa; sin embargo, también se puede observar la presencia de xilosa, fructuosa y sacarosa.
- Son polímeros (la unidad estructural es el núcleo de flavan-3-ol), tales como catequina y/o epicatequina y epigallocatequina. Están formados por la unión de dos a seis unidades, las cuales se unen en posición del carbono 4 y 8. (p. 6).

### **Terpenos**

Los terpenos fueron separados e identificados por Otto Wallach, premio Nobel de Química Orgánica en 1910. En la actualidad, gracias al desarrollo y perfeccionamiento de técnicas analíticas cromatográficas, se han detectado unos 15.000 compuestos terpénicos. Numerosos científicos, al verse confrontados con esta enorme diversidad sin un significado aparente o difícil de interpretar, han calificado la investigación de los terpenos como de auténtica pesadilla. (Ormeño & Fernández, 2012, p. 64).

Los terpenos son hidrocarburos que pertenecen a la familia de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y las cetonas. Cuando las moléculas contienen átomos de oxígeno,

se da preferencia al término denominado terpenoide, aunque ambas denominaciones suelen utilizarse indistintamente. En las plantas, los terpenos se localizan principalmente en las hojas, flores y frutos, y en menor cantidad en los tallos, el tronco y las raíces. (Ormeño & Fernández, 2012.)

Estos compuestos forman parte de las emisiones volátiles de la planta, pero también se pueden acumular en su interior. En este caso, la especie presenta estructuras de almacenamiento, como las tricomonas glandulares en el romero, los canales resiníferos en los pinos, o las cavidades secretoras en los eucaliptos (Ormeño & Fernández, 2012).

### **Antraquinonas**

Las antraquinonas son un importante grupo de compuestos secundarios, que se pueden hallar en bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Se encuentran en un gran número de familias de plantas, donde se incluyen las *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Poligonaceae* y *Leguminosaceae*. El extracto de antraquinonas de las raíces de *M. elíptica* es empleado como antibacteriano, antifúngico y antileucémico. (Blanco, Paneca, Laffite & Sánchez, 2005).

Vélez, Campos & Sánchez (2014) encontraron que la adición de plantas con alto contenido de antraquinonas mejoró la producción de butirato y propionato, y además redujo la producción de metano y acetato; asimismo, se logró observar una baja disponibilidad de hidrógenos, por lo que se supone que la primera forma de acción de estos compuestos es a través de la inhibición de las arqueas ruminales.

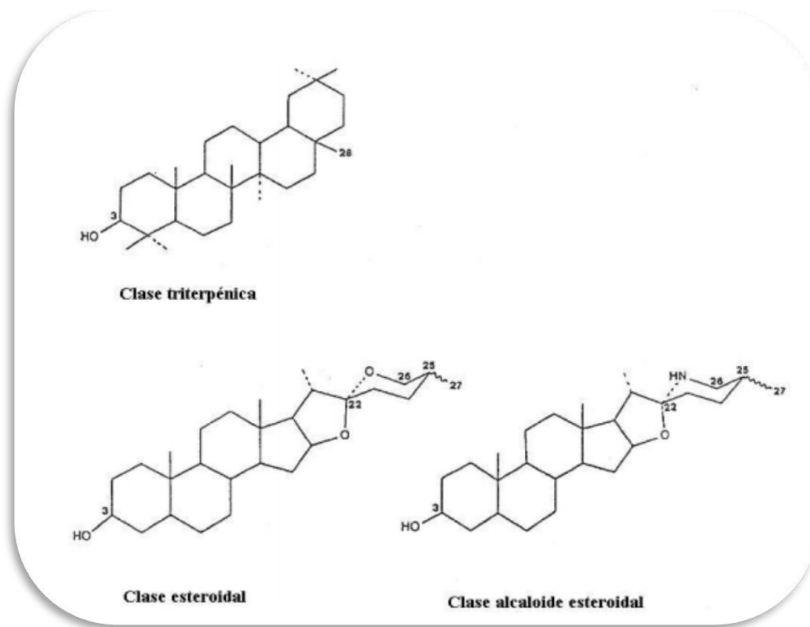
### **Saponinas**

Las saponinas son compuestos bioactivos encontrados principalmente en las plantas, pero también se pueden encontrar en algunos organismos marinos e insectos. Las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides. Los esteroides predominan en las plantas, y son compuestos con aproximadamente 27 átomos de carbono, que conforman la estructura central. Por otra parte, los triterpenoides están compuestos por agliconas con 30 átomos de carbono. (Thakur, Melzig, Fuchs & Weng, 2011).

Los tipos de saponinas más encontradas son los de la clase llamada triterpenoides, especialmente en leguminosas. Sin embargo, se puede lograr encontrar una gran variedad de

estos compuestos con propiedades biológicas diferentes, dependiendo de la modificación en la estructura de su anillo y el número de azúcares añadido. (Vélez *et al.*, 2014).

**Figura 23. Clases Principales de Saponinas**



Nota: Gianna (2013).

Martínez (2011) menciona que las saponinas esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares, mediante los ensayos de la espuma, hemólisis de glóbulos rojos, Liebermann-Burchard y ensayos para carbohidratos. El ensayo de espuma consiste en que, al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable, como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides.

### **Extracto**

Zapata (2002) define al extracto como una mezcla compleja, con una cantidad de compuestos químicos, que se obtiene por procesos físicos, químicos y microbiológicos a partir de una fuente natural, presentando los principios activos solubles separados del total de la extracción.

Según Zapata (2002, pp. 13-14), los problemas principales que presentan los extractos son:

- Los principios activos pueden ser diferentes compuestos, con estructuras químicas casi idénticas.
- El extracto puede tener una actividad mayor que el principio activo aislado y purificado.
- La matriz del extracto puede tener efectos técnicos inesperados: mayor estabilidad, mayor actividad, mayor tolerancia.
- El principio del extracto es difícil de identificar, aislar y cuantificar.
- El principio activo es un componente de la planta, o se ha formado un artefacto durante el proceso de extracción purificación.

### **Destilación a presión reducida (rota vapor)**

La destilación a presión reducida es un proceso en el que un líquido es convertido a vapor, mediante la variación de las condiciones de temperatura o presión, aumentando la concentración de los solutos presentes en el líquido. En este tipo de destilación se utiliza el rota vapor como equipo, para generar el vapor y lograr la destilación; sin embargo, para conseguir la ebullición, además del aporte de calor, se utiliza una bomba de vacío, que reduce la presión en el interior del matraz de destilación. (Peña, 2019).

**Figura 24. Equipo de destilación por rotavapor Yamato, modelo BM500.**



Nota: Elaboración propia (2020).

### **Extracción líquido-líquido mediante el embudo separador**

El término extracción se define como la transferencia de una sustancia de una fase a otra, siendo las más frecuentes las extracciones sólido-líquido entre dos líquidos inmiscibles. En la vida cotidiana se utilizan extracciones sólido-líquido como, por ejemplo, cuando se hace un té o un café. Extracciones similares se llevan a cabo en el laboratorio, aunque son mucho más frecuentes las extracciones líquido-líquido. (García, 2012).

García (2012, p. 1) manifiesta que normalmente uno de los líquidos es agua o una disolución acuosa, y el otro un disolvente orgánico no miscible con agua. En este contexto se utilizan los términos:

- Fase acuosa (FA, agua o disolución acuosa).

- Fase orgánica (FO, disolución o disolvente orgánico).

Por otra parte, aunque el proceso es el mismo, en el laboratorio se suele utilizar distinto nombre, dependiendo de su finalidad:

- Extracción: paso del compuesto de interés de una fase líquida a la otra.
- Lavado: eliminación de un compuesto no deseado de una fase orgánica, por extracción con una disolución acuosa.

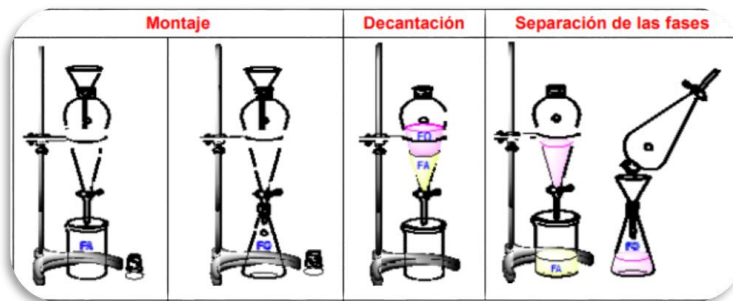
**Tabla 4. Disolventes inmiscibles más utilizados**

Disolvente	Densidad (g/mL)	Solubilidad en agua (g/100 mL)	Agua disuelta (g/100 mL)
Acetato de etilo	0.900	8.0	2.9
Diclorometano	1.325	2.0	1.3
Éter etílico	0.715	6.0	1.5
Hexano (Éter de petróleo)	0.659	0.001	0.01

Nota: García (2012).

Como se puede observar en la tabla, los disolventes inmiscibles pueden ser un poco más densos que el agua, como, por ejemplo, en el diclorometano y el acetato de etilo, por lo que en una extracción la fase orgánica puede ser menos o más densa que la fase acuosa, dependiendo del disolvente. Además, todos los disolventes son ligeramente solubles en agua y, a su vez, disuelven una pequeña cantidad de la misma, por lo que, al poner en contacto una fase acuosa y una orgánica, una pequeña parte de la fase acuosa y sus componentes pasarán a la fase orgánica y viceversa. (García, 2012).

**Figura 25. Montaje, Decantación y Separación de las Fases**



Nota: García (2012).

García (2012, p. 4) explica que el proceso de extracción lo implican tres etapas bien definidas:

- 1- Material e introducción de las fases: la extracción se realiza en un embudo de decantación, provisto de un tapón que ajuste perfectamente. El embudo se sujeta a un soporte con un aro metálico, colocando debajo del mismo un recipiente de recogida, para evitar pérdidas si hubiera fugas por la llave (vaso de precipitados solo para fases acuosas, Erlenmeyer para fases orgánicas). Las fases se introducen con un embudo cónico. Es aconsejable introducir primero la fase a extraer; así se puede lavar el recipiente con disolvente, disminuyendo las pérdidas.

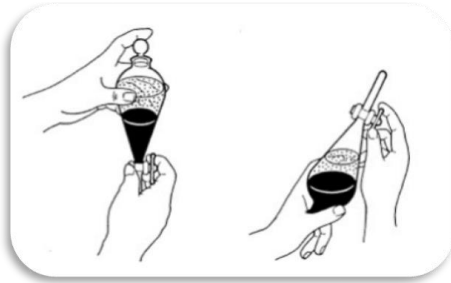
**Figura 26. Montaje de Equipo de Extracción**



Nota: Alpízar (2018).

- 2- Agitación de la mezcla: hay que agitar enérgicamente para un buen contacto entre las fases. Sin embargo, al agitar un disolvente, su presión de vapor aumenta, y por ello se agita suavemente al principio, para observar si el gas generado es abundante o escaso. Para evitar sobrepresiones, con el embudo tapado y sujeto firmemente (con una mano la llave y con otra el tapón) se coloca en posición casi horizontal y se agita suavemente; se invierte el embudo y se abre la llave para dejar salir el gas, tras lo cual se cierra y se agita de nuevo, repitiendo el proceso varias veces. Estas precauciones son especialmente importantes cuando, al entrar en contacto las fases, tiene lugar una reacción que genere gas; por ejemplo, al lavar una disolución ácida con  $\text{NaHCO}_3$  en la que se genera  $\text{CO}_2$ . En estos casos es conveniente agitar suavemente la mezcla con un movimiento circular, sin sacarla del aro de soporte antes de pasar a agitar.

**Figura 27. Liberación de Gas del Embudo Separador**



Nota: Alpízar (2018).

- 3- Separación de las fases y decantación: al finalizar la agitación, el embudo se coloca de nuevo sobre el aro, se quita o afloja el tapón para igualar presiones, y se deja reposar hasta la separación nítida entre las fases. La fase inferior (más densa) se saca abriendo la llave. Cuando queden aprox. 1-2 mL en el embudo, se cierra la llave, se levanta el embudo del aro y se le imprime un ligero movimiento circular, para que las gotas retenidas en las paredes desciendan. Se deja reposar de nuevo y se separa. El recipiente de recogida será un Erlenmeyer si la fase a recoger es la orgánica. La fase superior (menos densa) se saca por la boca del embudo, para evitar que se impurifique con los restos de la otra fase, que pueden quedar en el vástago del embudo.

### **Forma Farmacéutica**

Se denominan preparados farmacéuticos, formas medicamentosas, formas farmacéuticas o de dosificación, o simplemente preparados a los productos procedentes de la transformación de una droga, o de una asociación de drogas, mediante procedimientos farmacotécnicos, con el fin de darles características físicas y morfológicas particulares, que faciliten su administración y acción farmacológica, pero sin dosis establecidas. (Domínguez, 2018).

Se emplean los principios activos y excipientes, que dan como resultado una forma farmacéutica. La formulación implica la realización de diferentes estudios, para conocer la pureza, solubilidad, capacidad de absorción, estabilidad, compatibilidad con excipiente y otras propiedades específicas de la forma farmacéutica. (Condori, 2015, p. 8).

Condori (2015) menciona que, además, es una mezcla de determinadas proporciones e ingredientes en orden específico, hasta logra obtener ciertas condiciones finales propias del producto en estudio, para lo cual se deben conocer las características de cada uno de los ingredientes.

#### **Colutorio Antiséptico**

Los colutorios son preparaciones líquidas destinadas a ser aplicadas sobre los dientes, las mucosas de la cavidad oral y faringe, con el fin de ejercer una acción local antiséptica, astringente o calmante. El vehículo más comúnmente utilizado en los colutorios es el agua, y los principios activos son principalmente antisépticos, antibióticos, antifúngicos, astringentes y antiinflamatorios. (Carretero, Esparza, Figuero & Cerero, 2004).

Fine (1995) dice que los métodos de control de placa bacteriana se enfocan en la remoción de la máxima cantidad posible de los depósitos acumulados sobre la superficie dentaria, por medio de técnicas mecánicas, llevadas a cabo por el mismo paciente, como el cepillado dental. El fundamento científico, de las técnicas mecánicas de eliminación de la placa, se basa en la hipótesis de la placa bacteriana inespecífica, según la cual toda placa bacteriana es igualmente patógena, por lo que el desarrollo de la caries y las enfermedades

periodontales estaría ligado principalmente a la cantidad de placa acumulada sobre las superficies dentarias. (Marzal, 2009. p. 22).

Los colutorios son utilizados normalmente para controlar las enfermedades periodontales; como forma de tratamiento, son muy atractivos, ya que son muy fáciles de utilizar para el paciente. El objetivo es alterar la cantidad y/o calidad de la placa supra y subgingival; de esta manera, el sistema inmunitario puede controlar las bacterias y prevenir la aparición o progresión de enfermedades periodontales. Un colutorio efectivo debe ser activo contra una amplia gama de especies bacterianas Gram+ y Gram-. (Rojas & Santos, 2005).

Idealmente, un agente antiséptico efectivo debería penetrar el biofilm bacteriano. Estudios recientes han sugerido que los fenotipos bacterianos pueden cambiar cuando los organismos mutan de un estado planctónico (en suspensión o flotando libres) a un estado sésil (como parte de un biofilm). Este cambio, unido al potencial efecto de secuestro de la matriz del biofilm, puede dar lugar a susceptibilidades alteradas frente a los agentes antibacterianos. Por tanto, la eficacia de cualquier enjuague antiséptico depende no solo de sus propiedades microbicidas que suelen demostrarse *in vitro*, sino también de su capacidad de penetrar el biofilm de la placa *in vivo*. (Serrano & Herrera, 2005).

Los enjuagues bucales presentan la ventaja de que su actividad antimicrobiana puede alcanzar las zonas de difícil acceso. Casi todos los métodos químicos de control de la placa bacteriana se fundamentan, también, en la hipótesis de la placa bacteriana inespecífica, ya que pretenden disminuir la formación de esta en general, evitar su adhesión a las superficies dentarias, alterar el metabolismo bacteriano, entre otros. (Marzal, 2009. p. 22).

Marzal (2009, p. 23) menciona que las sustancias químicas pueden actuar sobre la placa de diversas formas, impidiendo la adhesión de la placa por agentes antiadhesivos, impidiendo o enlenteciendo la proliferación bacteriana por medio de agentes antimicrobianos, eliminando la placa ya establecida, y alterando la patogenicidad de la placa.

Uno de los usos más extendidos de los colutorios es para tratar la gingivitis y periodontitis, donde estas patologías, según Marzal (2009), las define como:

Gingivitis: un proceso inflamatorio de la encía, en el cual el epitelio de inserción, aunque alterado por la enfermedad, se mantiene unido al diente en el nivel original, sin migración apical y, por tanto, sin pérdida de soporte periodontal. La gingivitis se produce por la acumulación inespecífica de placa, y se elimina mediante un control cuidadoso de esta. (p. 23).

Periodontitis: es también un proceso inflamatorio, y se diagnostica cuando se han producido la migración del epitelio y la pérdida de soporte periodontal. (p. 23).

Según Mosquetera & Veloz (2011, p. 23), los enjuagues bucales se clasifican de acuerdo con la cantidad de alcohol, de la siguiente manera:

- ❖ Ausencia de alcohol: son soluciones acuosas generalmente de flúor, utilizadas principalmente como aporte suplementario de flúor para prevención de las caries.
- ❖ Colutorios: su contenido de alcohol es nulo o inferior al 20%. Se utilizan sin diluir.
- ❖ Elixires: su contenido de alcohol es superior al 50%. Se administran diluidos en agua.

### **Composición de los enjuagues bucales**

En la composición de los enjuagues bucales se añaden principios activos, para lograr conseguir acciones antisépticas, anticaries, antiplaca, cicatrizantes o desensibilizantes. Se incorporan los mismos principios activos que en las pastas dentífricas, pero a mucho menor concentración. También se les añaden aromatizantes, ya que para el consumidor es muy importante la sensación refrescante en la boca, después de utilizar un enjuague bucal. Los más utilizados son: metilsalicilato, mentol, eugenol, ciclamato sódico, esencia de anís, entre otros. (Muñoz, s.f.).

Para Muñoz (s.f., p. 5), los enjuagues bucales deben presentar la siguiente composición:

***Agentes antiplaca.***

Como agentes antiplaca, se utilizan antisépticos con el propósito de reducir la flora bacteriana.

- ❖ Clorhexidina: se usa a concentraciones del 0,1 al 0,2%.
- ❖ Timol: es poco soluble en agua, pero se puede solubilizar con alcoholes adecuados o en soluciones acuosas con bórax. Se usa a concentraciones del 5%.
- ❖ Hexetidina y triclosán: a concentraciones del 0,12%, presentan su máxima eficacia.

***Agentes anticaries.***

Los enjuagues bucales utilizados para la prevención de la caries contienen flúor obligatoriamente. Se utilizan a las siguientes concentraciones de flúor:

- ❖ 225 ppm para enjuagues diarios: se trata de soluciones hidroalcohólicas mentoladas.
- ❖ 900 ppm para enjuagues semanales: se trata de soluciones acuosas con sabores frutales. Se emplean preferentemente en niños o en casos de tratamientos bucales.

***Agentes desensibilizantes.***

- ❖ Flúor: se utiliza en dosis elevadas del orden de 2.500 ppm o más.
- ❖ Nitrato potásico: es el agente desensibilizante más usado. Se emplea en concentraciones del 5%.
- ❖ Sales de estroncio: se usan a concentraciones del 10%. La sal más utilizada es el cloruro de estroncio.

### *Agentes gingivales.*

Se usa principalmente la alantoína, por sus propiedades cicatrizantes. Su inclusión en colutorio permite frenar el sangrado que produce el cepillado en personas con encías sensibles. Otros agentes gingivales utilizados son productos epitelizantes, antiinflamatorios y calmantes, tales como el permethol, dexpanthenol (provitamina B), glicirrizato di potásico y laureth-9. Además del uso de dentífricos, en materia de higiene bucodental es imprescindible una disciplina diaria en la limpieza de la cavidad bucal.

El empleo de cepillos dentales adecuados, la renovación periódica de estos, y la utilización de cepillos interdentes, deseada para aquellas zonas en las que no es suficiente el cepillo de dientes, son básicos para una limpieza eficaz. De la misma manera, las revisiones anuales del dentista y una correcta alimentación permitirán mantener en buen estado la salud de la boca.

En el mercado de la higiene bucodental se prevé que la importancia del canal farmacéutico aumente significativamente en los próximos años, en detrimento de otros canales de comercialización. El aumento, en la población, de patologías bucales, y la especificidad cada vez mayor de los dentífricos ofertados en farmacia, hacen que los odontólogos recomienden este tipo de productos. En este sentido, el farmacéutico, conocedor de la composición de dichos productos, tiene por delante una importantísima labor como consejero profesional de la salud.

**Colutorios a base de extractos naturales**

Hoy en día, los productos naturales se muestran como alternativa contra las enfermedades, en muchos de los cuales se encuentran extractos de plantas, como, por ejemplo, té verde, aloe vera, propóleos, manzanilla, diente de león, entre otros. Dichos productos naturales son vistos como productos de gran importancia en cuanto a su efecto antimicrobiano, y cada día son más avalados por estudios, donde demuestran su uso clínico. (Castañeda, 2019).

Los productos de higiene oral han ido mejorando, porque se han agregado ingredientes de hierbas o extractos que son beneficiosos para la salud oral, combatiendo la placa bacteriana, la gingivitis y otras enfermedades de encías. Actualmente, muchos productos naturales siguen comercializándose en otras marcas, asegurándose que presentan efectos terapéuticos sobre la salud general de los pacientes. (Castañeda, 2019).

### CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

#### **Enfoque**

El enfoque de esta investigación será cuantitativo. Hernández, Fernández & Baptista (2014) mencionan que:

El enfoque cuantitativo (que representa, como dijimos, un conjunto de procesos) es secuencial y probatorio. Cada etapa precede a la siguiente y no podemos “brincar” o eludir pasos. El orden es riguroso, aunque desde luego, podemos redefinir alguna fase. Parte de una idea que va acotándose y, una vez delimitada, se derivan objetivos y preguntas de investigación, se revisa la literatura y se construye un marco o una perspectiva teórica. (p. 4).

La razón por la cual esta investigación es cuantitativa es porque, se harán mediciones y se controlarán las variables

#### **Diseño de la investigación**

La investigación cuenta con dos tipos de diseño, el primero que se presenta es el explicativo, en el cual:

[...] van más allá de la descripción de conceptos o fenómenos o del establecimiento de relaciones entre conceptos; es decir, están dirigidos a responder por las causas de los eventos y fenómenos físicos o sociales. Como su nombre lo indica, su interés se centra en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta o por qué se relacionan dos o más variables. (Hernández *et al.*, 2014, p. 95).

Por esta razón, con los resultados que se obtengan en la siguiente investigación, se determinará si el extracto de la *Neurolaena lobata* presentará un efecto antimicrobiano frente al *Streptococcus mutans*; esto se realizará por medio de pruebas fitoquímicas, y así se determinarán los tipos de metabolitos secundarios presentes, y el diámetro del halo de inhibición de la cepa de la bacteria.

El otro diseño es el exploratorio, acerca del cual Hernández *et al.* (2014, p. 91) mencionan que estos diseños:

[...] se realizan cuando el objetivo es examinar un tema o problema de investigación poco estudiado, del cual se tienen muchas dudas o no se ha abordado antes. Es decir, cuando la revisión de la literatura reveló que tan sólo hay guías no investigadas e ideas vagamente relacionadas con el problema de estudio, o bien, si deseamos indagar sobre temas y áreas desde nuevas perspectivas.

En la revisión realizada no se encontraron estudios o reportes de sobre la actividad antimicrobiana de *Neurolaena lobata* (gavilana) frente al *Streptococcus mutans*, el cual es el principal microorganismo responsable de las caries dentales, una enfermedad de salud pública que afecta a muchas personas. Esta investigación puede despertar el interés, en investigadores, para crear formas farmacéuticas de origen natural con este extracto.

Tabla 5. Variables

Objetivo Específico	Variable	Definición conceptual	Indicador	Instrumentos
<b>Elaborar un fraccionamiento de los componentes de las hojas de <i>Neurolaena lobata</i> (gavilana) utilizando hexano, diclorometano y acetato de etilo, para separar los componentes del material según su polaridad.</b>	Fraccionamiento de componentes.	El fraccionamiento de componentes tiene como objetivo recuperar las diferentes fracciones o componentes de una solución: el solvente y el soluto. (Garritz, 2001).	Polaridad de las sustancias a utilizar.	Rotavapor. Embudo. Hexano. Diclorometano. Acetato de etilo.
<b>Realizar un tamizaje fitoquímico con las hojas de <i>Neurolaena lobata</i> (gavilana), con el fin de identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas.</b>	Tamizaje fitoquímico.	Permite determinar, cualitativamente, los principales grupos químicos presentes en una planta, y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos, para el aislamiento de los grupos de mayor interés. (Palacios, s.f.).	Metabolitos secundarios.	Pruebas químicas.
<b>Preparar un enjuague bucal (colutorio) a base del extracto de <i>Neurolaena lobata</i>, como coadyuvante en la prevención de la formación de placa bacteriana.</b>	Placa bacteriana.	La placa bacteriana es una entidad o masa estructurada específica, adhesiva, altamente variable, que se forma por el crecimiento y colonización de microorganismos sobre la superficie de los dientes, de las restauraciones y de los aparatos protésicos. (Montes, s.f.).	Estudios.	Artículos científicos, donde se va a comparar el colutorio preparado con otros colutorios a base de plantas de la misma familia.

Nota: Elaboración propia (2020).

**Materiales y equipos usados para los extractos de *Neurolaena lobata***

- *Neurolaena lobata* (gavilana).
- Embudo separador.
- Aro metálico.
- Goteros.
- Vidrio de reloj.
- Espátulas acanaladas.
- Pizeta.
- Soporte universal.
- Erlenmeyer 500 mL, 250 mL, 100 mL y 50mL.
- Beaker 500 mL, 250 mL, 100 mL y 50mL.
- Tubos de ensayo.
- Papel filtro.
- Balanza marca Ballar de  $2000.00 \pm 0.01$  g.
- Botella ámbar.
- Filtro al vacío.
- Rota vapor Yamato, modelo BM500.
- Viales.
- Buchner.
- Kitasato.
- Probeta.
- Bomba Zeny, modelo VP 125.

**Reactivos a utilizar**

- Etanol al 96%.
- Hexano.
- Diclorometano.
- Acetato de etilo.
- Éter etílico.
- HCl al 2%.
- Reactivo Dragendorff.
- Metanol.
- Limaduras de magnesio.
- HCl concentrado.
- KOH 0,5 mol/L.
- Cloroformo.
- Anhídrido acético.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Hidróxido de amonio 25%.
- $\text{FeCl}_3$  1%.
- Reactivo de Vainillina 1%.
- Reactivo de Lugol.
- Reactivo de Benedict.
- NaOH al 10%.
- Propilenglicol.
- Mentol.
- Sacarosa.
- Agua destilada.

**Procedimiento**

- 1- Se realizó la recolección de *Neurolaena lobata* en San Ramón de Alajuela, en febrero del 2020, donde se recolectaron 585,72 g, y se preparó un extracto a partir de las hojas de *Neurolaena lobata*
- 2- Se pesaron 500 g de *Neurolaena lobata*, y se procedió a colocarlos en una botella grande de color ámbar, las hojas previamente lavadas y secadas; luego se les agregó el disolvente, que en este caso era etanol al 70%, donde se midieron 730 mL de etanol al 96%, con 271 mL de agua destilada.
- 3- El frasco se cerró, se colocó en un armario oscuro, seco y fresco durante una semana, agitándolo ocasionalmente, mínimo una vez al día, hasta el fin del tiempo de maceración.
- 4- Luego de la semana se filtró, utilizando el Büchner, kitasato, papel filtro marca Fisherbrand y una bomba de vacío marca Zeny, modelo VP 125, hasta lograr separar todos los compuestos sólidos del extracto, que posteriormente se colocaron en un Erlenmeyer de 500 mL limpio y seco.

### Concentración del extracto por destilación con presión reducida

- 5- Lo recolectado en el proceso de filtración se concentró por rota vapor marca Yamato modelo BM500, donde el filtrado se colocó en un matraz de destilación de 500 mL; se calibraron la temperatura a 75 °C y la velocidad del equipo de rotación a 100 rpm, para concentrar el extracto, eliminando el etanol. El proceso concluyó hasta que no se destilara más cantidad de etanol.
- 6- Se obtuvieron 360 mL del extracto concentrado, el cual se dividió en dos partes: se utilizaron 180 mL para el tamizaje fitoquímico, el cual se guardó en una botella color ámbar, y los otros 180 mL se emplearon para el fraccionamiento.

### Fraccionamiento de los componentes de la hoja de *Neurolaena lobata*

Hexano:

- 1- Se tomaron 180 mL del extracto concentrado, y se dividió en tres partes; por lo tanto, se utilizaron tres embudos separadores, donde a cada uno se le colocaron 60 mL del extracto concentrado, y se le agregaron 30 mL de hexano.
- 2- Se mezcló levemente, sin generar emulsión, y liberando el gas de forma continua por la llave del embudo, hasta lograr equilibrar las presiones, y que no saliera más gas.
- 3- Se colocó el embudo separador en el soporte, y se retiró la tapa del embudo.
- 4- Se dejó reposar hasta lograr la separación de las fases. En el fondo se logró observar la fase más densa (acuosa) y la fase menos densa en la superficie (hexano).
- 5- Se retiró, por la boquilla de abajo, la fase acuosa, y por la boquilla de arriba el hexano. Al extracto acuoso se le realizaron tres extracciones, hasta obtener una coloración muy clara.
- 6- Se obtuvo la fracción del hexano; se colocó en una botella ámbar y se rotuló.
- 7- Se repitieron los pasos del 1 al 6, con diclorometano y acetato de etilo, hasta obtener las fracciones respectivas.

Comentado [AAW1]: sin este punto

8- Las fracciones se rotularon y fueron guardadas en refrigeración.

#### **Extracción con éter etílico.**

- 1- Se tomaron 100 mL del extracto crudo, se colocaron en un embudo separador y se les agregaron 25 mL de éter etílico. Esto se agitó suavemente (se liberó constantemente el gas), lo cual se hizo abriendo suavemente la llave del embudo.
- 2- Colocar el embudo de separación en el soporte, y se retira la tapa del embudo. Se deja reposar hasta que se dé la división clara de las dos fases. La fase más densa estará en el fondo, y la fase menos densa en la superficie (éter etílico).
- 3- Se recolectaron las dos fases en recipientes diferentes; la fase más densa (el extracto acuoso) se retiró de primera por la boquilla de abajo. En otro recipiente rotulado se colocó el extracto etéreo, el cual se retiró por la boca superior del embudo.
- 4- Se volvió a colocar el extracto acuoso en el embudo separador, y se agregaron de nuevo 25 mL de éter etílico (este proceso se realizó cinco veces). Se colocaron todos los extractos etéreos en el recipiente rotulado como extracto etéreo, y el acuoso se recuperó en el recipiente rotulado como extracto acuoso.
- 5- Al finalizar quedaron dos recipientes: uno con el extracto acuoso y otro con el extracto etéreo.

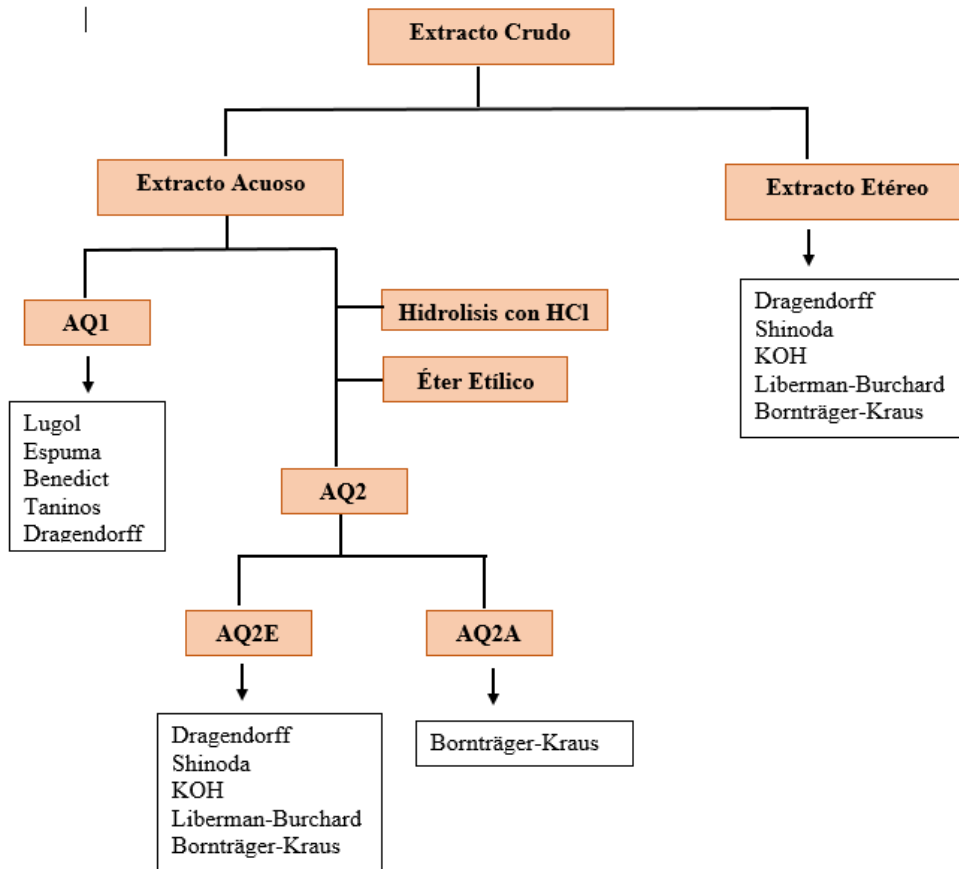
**Extracto Acuoso**

- 1- El extracto acuoso se dividió en dos recipientes de volúmenes iguales, rotulados como AQ<sub>1</sub> y AQ<sub>2</sub>.
- 2- Al extracto AQ<sub>2</sub> se le añadieron 10 mL de HCl 3 mol/L; se agitó bien y se calentó durante 20 minutos.
- 3- Se dejó enfriar, y la muestra fría se colocó en el embudo separador. Se procedió a realizarle cinco extracciones con el éter etílico, de igual manera que se realizó con el extracto original.
- 4- Se separó el extracto etéreo como AQ<sub>2E</sub>, y al acuoso como AQ<sub>2A</sub>.
- 5- La muestra AQ<sub>1</sub> se guardó, para más adelante realizar las respectivas pruebas.

**Extracto Etéreo**

- 1- Se procede a concentrar, hasta un volumen no mayor de 30mL.
- 2- Posteriormente, se realizan diferentes pruebas de identificación de metabolitos secundarios, utilizando el extracto anteriormente concentrado.

Figura 28. Proceso de separación para la elaboración del tamizaje fitoquímico



Nota: Elaboración propia (2020).

Figura 29. Extractos obtenidos rotulados y en recipientes



Nota: Elaboración propia (2020).

## **Pruebas de identificación de metabolitos secundarios utilizando el extracto etéreo**

### **Prueba de Dragendorff (Identificación de alcaloides)**

- 1- Se tomaron 4 mL del extracto etéreo, se colocaron en un tubo de ensayo, y se evaporaron completamente en baño María.
- 2- Se disolvió el residuo en 3 mL de HCl al 2%.
- 3- Se agregaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff (es importante recordar que este reactivo se debe agregar pegado a las paredes del tubo de ensayo).

### **Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides)**

- 1- Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo. Se evaporó completamente en un baño María, se disolvió el residuo en 2 mL de metanol y se calentó a baño María.
- 2- Se le agregaron limaduras de magnesio (en una pequeña punta de espátula).
- 3- Se colocó el tubo de ensayo en un beaker y se llevó a la capilla.
- 4- Se agregó 1 mL de HCl concentrado; se agitó suavemente el tubo de ensayo y se dejó reposar en el beaker.

### **Pruebas de KOH (Identificación de Cumarinas)**

- 1- Se tomaron 4 mL del extracto etéreo, y se colocaron en un tubo de ensayo. Se evaporó completamente en un baño María, y se disolvió el residuo en 1 mL de agua hirviendo.
- 2- Se colocaron, con un capilar, dos gotas en un papel de filtro (las gotas se pusieron bastante separadas).
- 3- Se encendió la lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm; se colocó el papel de filtro debajo de la lámpara, apuntando a una de las muestras

anteriormente aplicadas, y sobre la muestra se aplicó una gota de KOH 0,5 mol/L.

#### **Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triterpenos)**

- 1- Se tomaron 4 mL del extracto etéreo, y se colocaron en un tubo de ensayo; se evaporaron completamente en un baño María; se disolvió el residuo en 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  (cloroformo, usar en capilla).
- 2- Se adicionó al tubo de ensayo 1 mL de anhídrido acético; se agitó bien el tubo, y posteriormente se inclinó el tubo, y se le agregaron lentamente 3 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por las paredes del tubo, sin agitar. (todo este procedimiento se realizó en la capilla).

#### **Prueba de Bornträger-Kraus (Identificación de antraquinonas)**

- 1- Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; se evaporaron completamente en un baño María.
- 2- Se disolvió el residuo en 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25%.

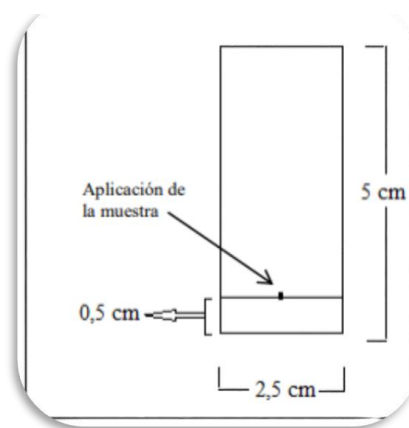
#### **Prueba de Taninos (Determinación de Taninos)**

- 1- Se tomaron 4 ml del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; se evaporaron completamente en un baño María; se disolvieron en agua caliente.
- 2- Se adicionaron 5 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 1%.

### Cromatografía de capa fina TLC (Determinación de Terpenos)

- 1- Se tomó con un capilar la muestra del extracto etéreo, se aplicó una pequeña cantidad en una placa cromatografía de capa fina de 5 x 2,5 cm, cuya fase estacionaria era de sílica gel con fluorescencia a 254 nm (TLC sílica gel F<sub>254</sub>), y se dejó que se evaporara el disolvente.

**Figura 30. Dimensiones de una placa cromatográfica para TLC**

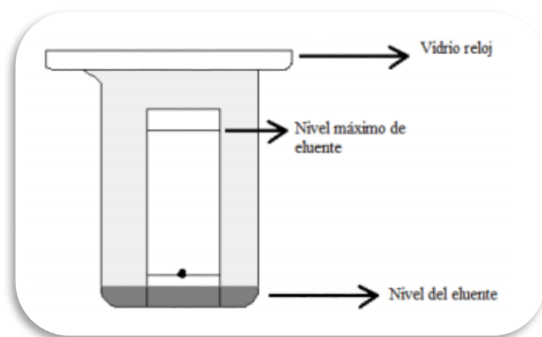


Nota: Alpízar (2018).

Fase móvil: 90% hexano y 10% de acetato de etilo (9:1).

- 2- Se preparó la fase móvil (eluyente) para correr la placa preparada con anterioridad. Se armó el sistema cromatográfico, tal y como se muestra en la figura 30 donde se observa que el nivel del eluyente no debe estar por encima del punto de aplicación de la muestra. Se logró observar el avance de la corrida, debido a que la placa se iba a impregnar (humedecer) con la fase móvil y, por último, se retiró la placa de la fase móvil la cantidad de 0,5 cm antes de que el eluyente tocara la parte superior de la placa.

**Figura 31. Sistema cromatográfico**



Nota: Alpízar (2018).

- 3- Se dejó secar bien la placa (TLC), y se observó con la luz UV a 254 y 365 nm. Posteriormente, se reveló la placa con el reactivo de vainillina.
- 4- El reactivo de vainillina se preparó *in situ*. Se tomaron 5 partes de la disolución al 1% de vainillina; esto se mezcló con una parte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50% en etanol, y se agitó bien. Luego, con un gotero, se impregnó toda la placa con el reactivo anteriormente preparado. Se dejaron caer unas gotas desde la parte superior de la placa, y dejándolo correr en línea recta por toda la placa hasta la base, se repitió el procedimiento con toda la placa, hasta impregnarla totalmente. Se dejó secar la placa.
- 5- Se quemó la placa de TLC, colocándola en un calentador-agitador con la parte metálica en contacto con el calentador, a un nivel de 5, y retirándola cuando la coloración se intensificó.

## **Pruebas de identificación con la muestra rotulada como AQ1**

### **Prueba de Lugol (Determinación de Almidón)**

- 1- Se tomaron 2 mL de AQ1, y esto se colocó en un tubo de ensayo; se añadió gota a gota el reactivo, hasta que la muestra se tornó azul.
- 2- Si la muestra no se tornaba azul, se añadiría más lugol, hasta un máximo de 2 mL del reactivo.

### **Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas)**

- 1- Se agregaron 3 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.
- 2- Se tapó el tubo de ensayo con papel parafina, y se agitó por un minuto.
- 3- Se dejó reposar en la gradilla por 20 minutos

### **Prueba de Benedict (Determinación de azúcares reductores)**

- 1- Se agregaron 3 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.
- 2- Se añadieron 10 gotas del reactivo Benedict; se agitó y se calentó la muestra en baño María.
- 3- Se esperó de 5 a 10 minutos.

Además, se hicieron las pruebas de Taninos y de Dragendorff, explicadas anteriormente.

**Pruebas de identificados a la muestra AQ<sub>2</sub>E**

- 1- Se concentró la muestra a un volumen de 30 mL aproximadamente, y se realizaron las pruebas de:
  - Prueba de Dragendorff (Identificación de alcaloides).
  - Prueba de Shinoda (Identificación de flavonoides.)
  - Prueba de KOH (Identificación de cumarinas).
  - Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triterpenos).
  - Prueba de Bornträger-Kraus (Identificación de antraquinonas).

**Pruebas de identificados a la muestra AQ<sub>2</sub>E****Prueba de Bornträger (Determinación de Antraquinonas)**

- 1- Se tomó 1mL de muestra y se llevó a un pH de 9, agregando lentamente y con agitación constante, gotas de una disolución de NaOH.
- 2- Se verificó el pH con tiras de papel pH. Si la disolución se torna azul, se sigue con el procedimiento; si no hay coloración azul, la prueba se cataloga como negativa. Si la disolución es azul, se agregan lentamente, y con agitación constante, gotas de una disolución de HCl, hasta formar una disolución roja.

**Determinación del peso seco del extracto acuoso de *Neurolaena lobata***

- 1- Se pesaron por triplicado, en una balanza analítica,  $\pm 0,0001$  g 3 viales vacíos y con tapa.
- 2- Se colocaron 2 ml con pipeta  $2 \text{ mL} \pm 0.01 \text{ mL}$  del extracto acuoso de la *Neurolaena lobata*.
- 3- Se colocó en la estufa a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , hasta que se evaporara completamente.
- 4- Se pesaron los viales con el extracto evaporado, se determinó la diferencia de masas, y se determinó un promedio.

**Elaboración del Colutorio**

- 1- Se colocó en un beaker 1 g de mentol con 25 ml de agua, y se colocó en un calentador, a una temperatura aproximadamente de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , hasta que se diluyera el mentol.
- 2- Se agregaron 10 mL de propilenglicol, y con un agitador magnético se mezcló por unos 5 minutos.
- 3- Se agregó 1 g de Sacarina y se mezcló por un minuto.
- 4- Se agregaron 2 mL de extracto acuoso de *Neurolaena lobata*.
- 5- Se agregó agua destilada c.s.p 100 ml.
- 6- Se colocó en un envase y se dejó reposar por 24 horas, para que desapareciera la espuma durante el proceso de preparación.

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### Obtención del extracto de *Neurolaena lobata* (gavilana)

En primer lugar, se realizó la recolección del material vegetal, donde las hojas se lavaron cuidadosamente una por una, se secaron manualmente con toallas de papel, y se eliminaron material extraño y hojas que no estaban en buen estado, para así realizar la preparación con las hojas de *Neurolaena lobata*, con el fin de poder lograr obtener el extracto de dicha planta para todas las pruebas necesarias.

**Figura 32. Hojas de *Neurolaena lobata* Recolectadas**



Nota: Elaboración propia (2020).

Se procedió a cortar, lo más finamente posible, las hojas que se recolectaron, y se colocaron en una botella grande color ámbar, junto con etanol al 70%, que anteriormente ya se había preparado. Esto se almacenó en un lugar donde la botella no tuviera contacto con la

luz, para así evitar que tuviera algún tipo de descomposición. Se dejó almacenado por una semana, y posterior a ese lapso, se filtró por medio del büchner y kitasato, utilizando papel filtro y una bomba al vacío, para lograr eliminar material sólido presente, que más adelante pudiera afectar las pruebas y los análisis.

**Figura 33. Filtrado por Medio de Büchner y Kitasato**



Nota: Elaboración propia (2020).

El extracto obtenido después de la filtración presentó una coloración verde oscuro, el cual fue llevado al rotavapor, para así lograr eliminar el disolvente, que en este caso era el etanol, donde se obtuvieron 360 mL libres de etanol, siendo este el extracto de *Neurolaena lobata*, que fue almacenado en refrigeración dentro de una botella oscura debidamente rotulada

**Figura 34. Rotavapor**



Nota: Elaboración propia (2020).

**Figura 35. Metodología empleada en la obtención del extracto de las hojas de *Neurolaena lobata***

Comentado [AAW2]: Nivel 1

Lavado y secado de hojas.

Se colocó en una botella color ámbar con etanol al 70%.

Una semana después se filtró al vacío.

Rotavapor a 60 °C y 100 rpm.

Extracto de las hojas de *Neurolaena lobata*.

Nota: Elaboración propia (2020).

**Fraccionamiento de los componentes de la hoja de *Neurolaena lobata*****Tabla 6. Caracterización de los extractos obtenidos a partir del fraccionamiento de las hojas de *Neurolaena lobata***

Extracto	Volumen	Color
Hexano	140 mL	Transparente
Diclorometano	71 mL	Verde muy claro
Acetato de Etilo	330 mL	Amarillo Oscuro

Nota: Elaboración propia (2020).

Para el fraccionamiento de los componentes de las hojas de *Neurolaena lobata* se utilizaron tres disolventes diferentes; en primer lugar, con hexano, donde se obtuvieron 140 mL, y presentó una coloración transparente. Después se realizó con diclorometano y se obtuvieron 71 mL con una coloración verde muy claro, y por último con acetato de etilo, donde se obtuvo 330 mL con una coloración amarilla oscura.

El propósito del fraccionamiento era lograr separar los diferentes componentes del extracto crudo según su polaridad, donde había menos polares en hexano, seguidos de diclorometano y más polares en acetato de etilo. Luego de la extracción, se colocó cada una en botellas de color ámbar, y se guardó en refrigeración, para así evitar la formación de microorganismos.

**Figura 36. Fraccionamiento de los Componentes de *Neurolaena lobata* en Botellas**



Nota: Elaboración propia (2020).

Es importante mencionar que el propósito de este proceso era: con estos extractos obtenidos, poder realizar las pruebas microbiológicas, para así determinar si la *Neurolaena lobata* presentaba actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*.

En un estudio que realizaron Ávila, Baquero, Viña & Murillo (2006), el objetivo era determinar la actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*; en primer lugar, los extractos fluidos fueron preparados por los procesos de maceración y soxhlet (50 °C), con el fin de evaluar el rendimiento del método extractivo. En ambos procesos se empleó una relación 1:4, material vegetal-etanol del 96%; la extracción se realizó hasta el agotamiento de la muestra. El producto se llevó a sequedad, y luego se utilizó el método líquido-líquido con éter de petróleo y acetato de etilo, obteniéndose así los subextractos E. petrol, AcOEt e hidroalcohólico (H<sub>2</sub>O-OH).

De los tres subextractos que se obtuvieron, solamente presentó actividad el de acetato de etilo, que en su fraccionamiento por cromatografía en columna abierta permitió que se obtuvieran seis fracciones, de las cuales el número cuatro fue la que mostró mayor actividad antibacteriana, y se generaron cuatro subfracciones, siendo la 4.3 la más activa, como muestra la figura 37; por lo tanto, se puede decir que esta planta presenta actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*.

**Figura 37. Actividad antibacteriana de las fracciones y subfracciones de *Diplostephium tolimense***

Fracción o Control	Halo de inhibición (Diámetro en cm)
F1	1.4
F2	1.66 ± 0.047
F3	1.76 ± 0.047
F4	1.9
F5	1.7
F6	1.46 ± 0.047
Gentamicina	2.6
DMSO	-
S.F 4.1	1.06 ± 0.047
S.F 4.2	1.13 ± 0.047
S.F 4.3	1.93 ± 0.047
S.F 4.4	1.1
Gentamicina	2.6
DMSO	-

F: Fracciones. S.F: Subfracciones. DMSO: Dimetilsulfoxido (-): Sin actividad antibacteriana.

Nota: Ávila *et al.* (2006).

**Tabla 7. Obtención de la masa del extracto acuoso de las hojas de Neurolaena lobata**

Extracto	Muestra	Peso de viales vacío con tapa (g)	Peso de viales + sólido obtenido con tapa (g)	Masa del sólido obtenido	Promedio de la masa del sólido (g)
	1	11, 4316 g	11, 4751 g	0,0435 g	0,0543 g
	2	11,4321 g	11, 4812 g	0,0491 g	
	3	11, 3513 g	11, 4215 g	0,0702 g	

Nota: Elaboración propia (2020).

Como se puede observar en la tabla 7, la masa promedio de las tres muestras del extracto es de 0,0543 g; esto quiere decir que la relación de la masa sería 0,0543 g por cada 2 ml del extracto, lo cual equivale a 10 g de masa en los 360 ml del extracto acuoso que se obtuvo, dando una concentración de masa/volumen de 3% m/v.

La fórmula que se obtuvo para obtener la concentración m/v fue la siguiente:

$$\% \frac{m}{v} = \frac{\text{masa obtenida del extracto (g)}}{100 \text{ mL del extracto}} * 100$$

Donde la masa de sólido a partir del extracto es de 10 gramos, y el volumen del extracto acuoso es de 360 mL

### **Pruebas de Identificación para el tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de *Neurolaena lobata***

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación, y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico. (Sharapin, 2000).

Así, cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico, y hay presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloide. De la misma manera, el hecho de evidenciarse la presencia de flavonoides en el “screening” fitoquímico y una acción antiinflamatoria en el “screening” farmacológico, esta última puede asociarse a la fracción de flavonoides. Esta fracción puede, entonces, ser aislada y sometida a pruebas más específicas. (Sharapin, 2000).

En el proceso del tamizaje fitoquímico de los componentes activos de las hojas de *Neurolaena lobata*, se tomaron en cuenta todas las pruebas, como se observa en la tabla 8, para así lograr obtener resultados más completos. Se analizaron alcaloides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, antraquinonas, taninos, terpenos, almidón, saponinas y azúcares reductores. En la tabla 9 se observa un resumen de los resultados que se obtuvieron.

**Tabla 8. Pruebas de Caracterización de Metabolitos Realizadas a Cada Extracto  
Obtenido del Fraccionamiento de las hojas de *Neurolaena lobata***

<b>Extracto</b>	<b>Prueba</b>
<b>Etéreo</b>	Identificación de: alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, taninos y terpenos.
<b>AQ<sub>2E</sub></b>	Identificación de: alcaloides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, antraquinonas.
<b>AQ<sub>1</sub></b>	Identificación de: alcaloides, taninos, almidón, saponinas y azúcares reductores.
<b>AQ<sub>2A</sub></b>	Identificación de: antraquinonas.

Nota: Elaboración propia (2020).

En la tabla 8 se puede lograr observar la división más clara de las pruebas que se le realizó a cada extracto por separado, luego de realizar la retirada al extracto acuoso; de esta manera se logra entender, con mucha más claridad, el tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de *Neurolaena lobata*.

**Tabla 9. Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de los extractos de *Neurolaena lobata***

Prueba	Identificación	Resultado que indica presencia	Extracto	Resultado
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	Precipitado anaranjado	E	-
			AQ <sub>2</sub> E	-
			AQ <sub>1</sub>	+++
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	Coloración rojo oscuro	E	++
			AQ <sub>2</sub> E	+++
<b>KOH</b>	Cumarinas	Coloración verde alrededor de la muestra	E	+
			AQ <sub>2</sub> E	++
<b>Lieberman Burchard</b>	Triterpenos	Formación de un anillo en medio de las fases de color rojo-marrón/verde esmeralda	E	-
			AQ <sub>2</sub> E	-
<b>Borntäger-Kraus</b>	Antraquinonas	Coloración rojo oscuro	E	+
			AQ <sub>2</sub> A	-
			AQ <sub>2</sub> E	+
<b>Taninos</b>	Taninos	Color azul: taninos gálicos Color verde: taninos catéquicos	E	+++
			AQ <sub>1</sub>	+
<b>Cromatografía (TLC)</b>	Terpenos	Manchas azules o moradas	E	+++
<b>Lugol</b>	Almidón	Color Azul	AQ <sub>1</sub>	-
<b>Espuma</b>	Saponinas	Presencia de espuma	AQ <sub>1</sub>	-
<b>Benedict</b>	Azúcares reductores	Formación de precipitado rojo ladrillo	AQ <sub>1</sub>	-

(+++) = muy positivo; (++) = positivo; (+) levemente positivo; (-) negativo.

Nota: Elaboración propia (2020).

Luego de realizar el tamizaje fitoquímico al extracto etanólico de las hojas de *Neurolaena lobata*, que se muestra en la tabla 9, se logró observar la presencia de metabolitos secundarios, como alcaloides, cumarinas, antraquinonas, taninos, terpenos y flavonoides, y la ausencia de triterpenos, saponinas y polisacáridos, como el almidón y azúcares reductores.

**Tabla 10. Metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Neurolaena lobata***

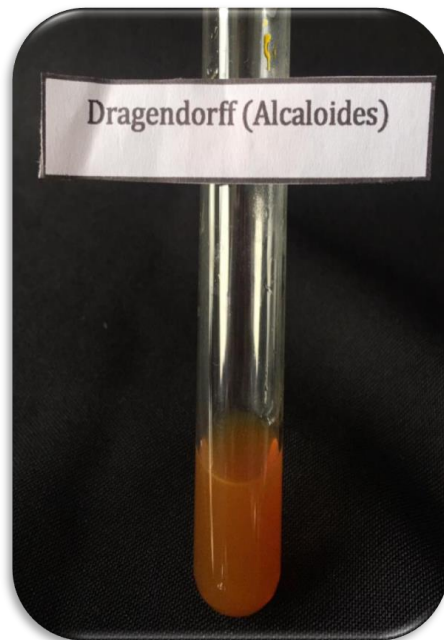
	<b>Metabolitos secundarios presentes en las hojas de <i>Neurolaena lobata</i></b>
<b><i>Neurolaena lobata</i> (gavilana)</b>	Alcaloides
	Flavonoides
	Cumarinas
	Antraquinonas
	Terpenos
	Taninos

Nota: Elaboración propia (2020).

En la tabla 10 se pueden observar, de una manera más clara, los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Neurolaena lobata* (gavilana).

## Alcaloides

**Figura 38. Resultado de la Prueba de Dragendorff en AQ1**



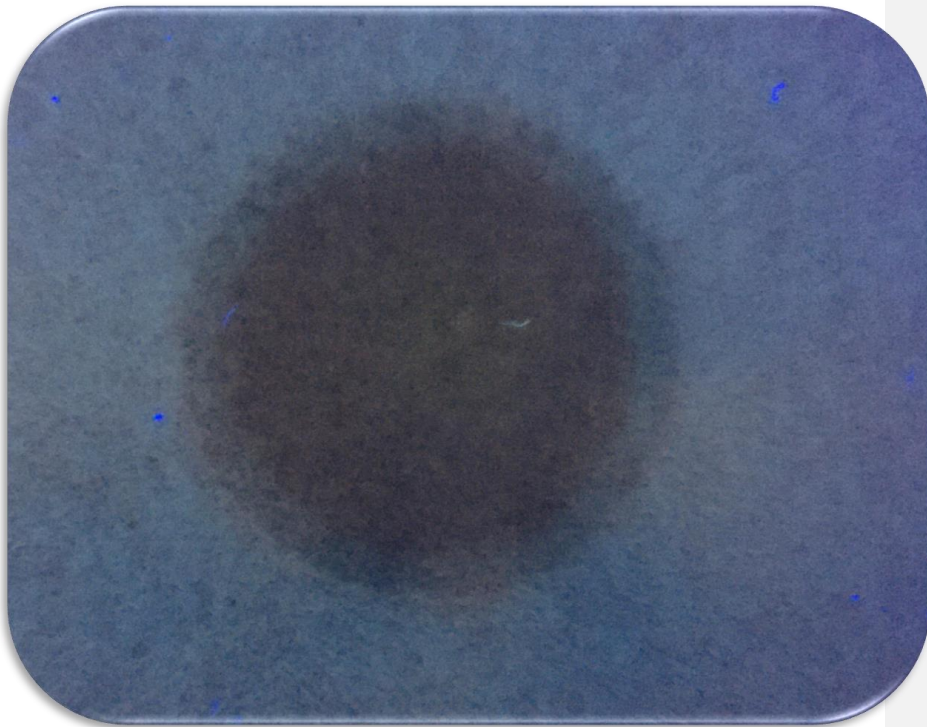
Nota: Elaboración propia (2020).

En la figura 38 se observa una coloración anaranjada, indicando la presencia de alcaloides en las hojas de *Neurolaena lobata*. Según Palacios (2013), cuando hay una formación de un precipitado anaranjado, indica la presencia de alcaloides en la hoja de *Neurolaena lobata*.

Barrera, Guzmán, Hernández, González & Aguilar (2009) realizaron un tamizaje fitoquímico a la *Tagetes erecta* Lin, más conocida como flor de muertos, la cual pertenece a la familia Asteraceae. Se encontró la presencia de alcaloides, la cual coincide con el tamizaje

fitoquímico que se le realizó a la *Neurolaena lobata*, donde se dio la presencia de este metabolito secundario.

Por otra parte, en un estudio hecho por Leiva (2015), se realizó el tamizaje fitoquímico a *Caxamarca sanchezii*, se evidenció la presencia de bastantes alcaloides en las raíces y poca cantidad en las hojas. En esta familia Asteraceae predominan los alcaloides de tipo pirrolizidínicos y, además, en otros estudios se han evidenciado los indólicos. (Castells, Mulder & Pérez, 2014).

**Cumarinas****Figura 39. Resultado de la Prueba de KOH**

Nota: Elaboración propia (2020).

Se logra observar en la figura 40 que alrededor de la muestra dio una coloración verde fosforescente, indicando la presencia de cumarinas en las hojas de *Neurolaena lobata*, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o azul-verdosa en la cámara UV que se aprovecha para su detección (García, et al. 2009)

En 1999, Kier & Tute escribieron sobre la importancia de este metabolito secundario, el cual se considera un poderoso antioxidante, ya que contribuye al buen desarrollo de las actividades metabólicas de los vertebrados superiores; además, mencionan que las cumarinas son importantes en la disminución del colesterol, la regeneración de células hepáticas, el aumento de protección contra infecciones virales, microbianas, y la protección contra el cáncer; ayudan al fortalecimiento del sistema cardiovascular y fortalecen el sistema inmune, ya que potencian las funciones de las vitaminas.

Según Ribeiro & Kaplan (2002), la aparición de cumarinas en asterales es muy significativa; sin embargo, es importante manifestar que las cumarinas de Asteraceae son solamente de un tipo, cumarinas simples. Estas cumarinas simples son las más diseminadas de Asteraceae; su ocurrencia es del 96.68% con respecto a las otras familias, donde las cumarinas son consideradas marcadores quimiotaxonómicos, como el Apiaceae y Rutaceae.

Por otra parte, Leiva (2015) realizó el tamizaje fitoquímico de *Caxamarca sanchezii*, donde se dio la presencia de cumarinas y, además, menciona que estos metabolitos son los responsables de actividades farmacológicas muy importantes como anticoagulantes, antitrombóticas, antiulcerosas, anticancerígenas, antiinflamatorias y antiespasmódicas.

## Flavonoides

**Figura 40. Resultado de la Prueba de Shinoda en AQ<sub>2</sub>E**



**Figura 41. Resultado de la Prueba de Shinoda en extracto etéreo**



Nota: Elaboración propia (2020).

En las figuras 41 y 42 se observa una coloración roja oscura, indicando la presencia de flavonoides en las hojas de *Neurolaena lobata*. Según Soto (2015), se permite reconocer la presencia de los metabolitos cuando el ensayo se colorea de amarillo, anaranjado, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

En el tamizaje fitoquímico que realizaron Barrera et al. (2009), también dio positivo en las hojas de *Tagetes erecta* Lin, la cual es la misma familia que la gaviñana. Estos compuestos forman puentes con el colágeno; por lo tanto, se va a aumentar la barrera protectora en el caso de los tumores. (Hernández, Hung, Audivert & Delgado, 2004).

Ávila et al. (2006) realizaron un estudio, donde evaluaron la actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense*, el cual pertenece a la familia de Asteraceae, y realizaron el tamizaje fitoquímico, y dio positiva la prueba de flavonoides, donde lo hicieron a través de cromatografía de capa delgada, de acuerdo con el tipo de metabolito buscado. Particularmente, con este compuesto confirmaron la presencia; al observarlo en una placa con la luz UV a 365 nm vieron una serie de manchas verdes y azules.

Lima & Morales (2014) realizaron una investigación sobre la caracterización farmacobotánica de la *Neurolaena lobata*, y en el tamizaje que se realizó tuvieron la presencia de flavonoides, hecho mediante cromatografía, donde se relacionó con las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, analgésicas.

## Antraquinonas

**Figura 42. Resultado de la Prueba de Bornträger-Kraus en AQ2E**



**Figura 43. Resultado de la Prueba de Bornträger-Kraus en extracto etéreo**



Nota: Elaboración propia (2020).

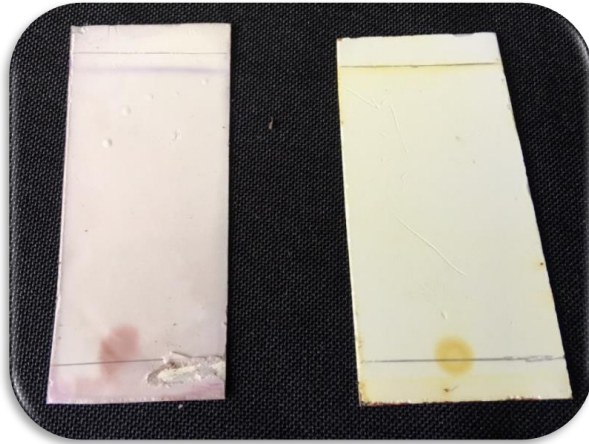
En las figuras 43 y 44 se logra observar una coloración roja oscura, indicando la presencia de antraquinonas en las hojas de *Neurolaena lobata*. Según Alpizar (2018), si la planta cuenta con la presencia de este metabolito, la disolución se tornará de un color rojo oscuro. Cuanto más claro sea el color, habrá menos presencia de metabolito.

En un estudio hecho por Gratti, Feijóo, Barrientos, Peneff & Laztra (2014), realizaron el tamizaje fitoquímico a *Senecio subpanduratus*, el cual pertenece a la familia Asteraceae, y dio positivo en antraquinonas, presentando similitud al tamizaje realizado por la autora del presente trabajo a la *Neurolaena lobata*, la cual también pertenece a la familia Asterácea.

Lima *et al.* (2014), en el tamizaje fitoquímico realizado a la *Neurolaena lobata*, presentaron la presencia de antraquinonas, de manera que coincide con el tamizaje que la autora del presente estudio realizó. López (1992) menciona que este metabolito otorga efectos un poco irritantes; por lo tanto, podría ser utilizado en el tratamiento de afecciones dermatocutáneas.

## Terpenos

**Figura 44. Resultado de la Cromatografía en Capa Fina  
(Revelado con vainillina y con yodo metálico)**

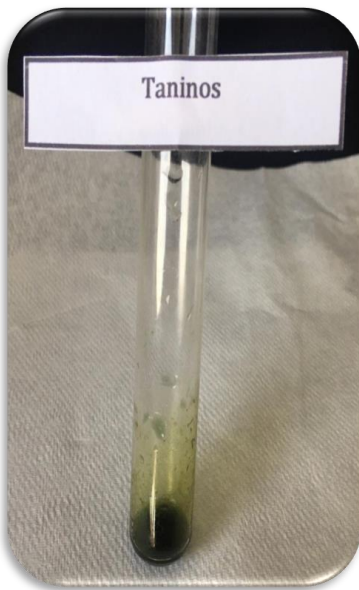


Nota: Elaboración propia (2020).

Esta prueba de terpenos se realizó mediante la cromatografía de capa fina, donde se reveló con el reactivo de vainillina (imagen de la izquierda), presentando una mancha morada, indicando la presencia de terpenos en las hojas de *Neurolaena lobata*. Además, se le hizo la revelación con yodo (imagen de la derecha), presentando una coloración amarilla oscura.

**Taninos**

**Figura 45. Resultado de la Prueba de Taninos en extracto etéreo**



**Figura 46. Resultado de la Prueba de taninos en AQ1**



Nota: Elaboración propia (2020).

En las figuras 46 y 47 se puede observar una coloración verde oscuro, donde se indica la presencia de taninos catéquicos. Según Alpizar (2018), si la disolución se torna de un color azul, se sugiere la presencia de taninos gálicos, y si la coloración es verde, se sugiere la presencia de taninos catéquicos.

En un estudio hecho por Chonate & Figueroa (2011) realizaron un tamizaje fitoquímico a *Artemisia absinthium* (Asteraceae) e identificaron taninos, que, al ser metabolitos secundarios, se encuentran distribuidos en el reino vegetal con propiedades farmacológicas como: antioxidantes, antiinflamatorios, antiagregantes plaquetarios, antimicrobianos y quimioprotectores.

El estudio realizado por Lima *et al.* (2014) demostró la presencia de taninos, lo cual se relaciona con propiedades astringentes, vasoconstrictoras, antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas y nematocidas, lo cual también coincide con la presente investigación de la autora.

### Preparación del enjuague bucal

Se elaboró un enjuague bucal a base del extracto acuoso de las hojas de *Neurolaena lobata* (gavilana) al 1%, donde su función principal es la prevención de las caries dentales. Su formulación es la siguiente, donde cada 100 ml contienen:

**Tabla 11. Formulación del enjuague bucal**

<b>Extracto acuoso de las hojas de <i>Neurolaena lobata</i></b>	1.00 MI
<b>Propilenglicol</b>	10.0 mL
<b>Mentol</b>	1.0 g
<b>Sacarosa</b>	1.0 g
<b>Saborizante (Menta)</b>	0,05 mL
<b>Agua destilada c.s.p.</b>	100 mL

Nota: Elaboración propia (2020).

Se procedió a la formulación del colutorio o del enjuague bucal. Dentro de la formulación se consideraron los reactivos más importantes como agentes refrescantes; en este caso se utilizó el mentol, los agentes humectantes como el propilenglicol, un saborizante como la menta, un edulcorante como la sacarosa y el principio activo, que es el extracto acuoso de las hojas de *Neurolaena lobata* (gavilana).

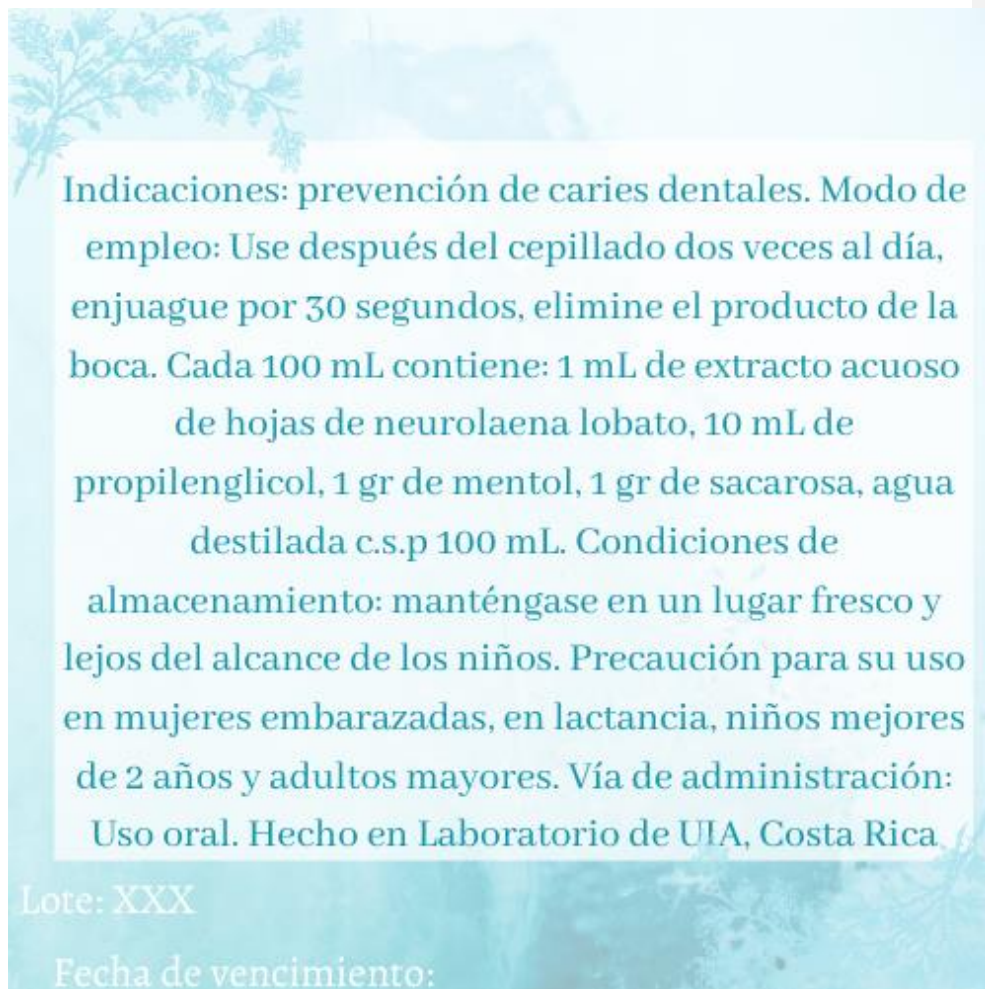
Se realizó una etiqueta, siguiendo los parámetros establecidos por RTCA 11.04.41:06, que son los requisitos de etiquetado de productos naturales medicinales para uso humano, como se muestra en las figuras 48 y 49.

**Figura 47. Etiqueta delantera del enjuague bucal a base del extracto acuoso de las hojas de *Neurolaena lobata* (Gavilana)**



Nota: Elaboración propia (2020).

**Figura 48. Etiqueta trasera del enjuague bucal a base del extracto acuoso de las hojas de *Neurolaena lobata* (Gavilana)**



Nota: Elaboración propia (2020).

Se reconoce al *Streptococcus mutans* como el microorganismo de mayor importancia en el inicio de las caries dentales; por este motivo es importante diseñar medidas de prevención, que sean dirigidas hacia el control de esta bacteria en la cavidad oral. Es importante mencionar el uso de antimicrobianos y antisépticos, que se utilizan desde hace muchos años, en conjunto con un correcto cepillado de dientes, para lograr tener un control, eliminando la placa bacteriana. (Álvarez, 2013).

Las plantas medicinales son parte del protagonismo que tuvieron en los primeros tratamientos médicos, y nuevamente han surgido las aplicaciones terapéuticas con ellas. (Álvarez, 2013). Un ejemplo muy claro sería el colutorio a base del extracto acuoso de las hojas de *Neurolaena lobata* (gavilana), al cual se le podrían aplicar todas las pruebas necesarias para que salga al mercado como un excelente bacteriostático, actuando sobre el principal microorganismo responsable de la formación de la placa bacteriana.

En un estudio realizado por Álvarez (2013), hizo un colutorio a base de *Matricaria chamomilla* (manzanilla), de la familia Asteraceae, con una concentración de 0,08 ml al 0,50%, y mediante la prueba de Duncan, pudo determinar la existencia del efecto antibacteriano sobre la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus mutans*. Por lo tanto, las plantas medicinales de la familia Asteraceae, como la *Neurolaena lobata*, podrían ser una buena opción para el control de la placa bacteriana.

Por otra parte, en un estudio realizado por Padilla (2015), se preparó un colutorio a base de los extractos secos totales de salvia y manzanilla, que, mediante el método de rayado de Mitscher, con una concentración de 10000 ppm, presentó actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*. De igual manera, se pudo obtener, por medio de otro estudio, la comprobación de que la *Matricaria chamomilla* presentaba actividad antibacteriana frente a este microorganismo, siendo una excelente opción para esta patología.

Comentado [AAW3]: se realizó

Comentado [AAW4]: estas unidades de mL a qué se refieren?

**Figura 49. Enjuague bucal a base de las hojas de Neurolaena lobata (parte delantera)**



Nota: Elaboración propia (2020).

**Figura 50. Enjuague bucal a base de las hojas de Neurolaena lobata (parte trasera)**



Nota: Elaboración propia (2020).

**Tabla 12. Características del enjuague bucal**

<b>Color</b>	<b>Verde claro</b>
<b>Consistencia</b>	Líquido
<b>Cantidad</b>	500 mL
<b>Olor</b>	A mentol

Nota: Elaboración propia (2020).

En la tabla 12 se pueden observar las características que presentó el enjuague bucal a base del extracto acuoso de las hojas de *Neurolaena lobata*, donde su coloración es verde muy claro, su consistencia es bastante líquida; se prepararon 500 mL del colutorio; su olor es a mentol, bastante refrescante, presentando características similares a los que hoy en día hay en el mercado.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Se logró la separación del etanol del extracto de *Neurolaena lobata* que se esperaba, obteniendo aproximadamente 700 mL de este, el cual se utilizó para el fraccionamiento, el tamizaje fitoquímico y la preparación del enjuague bucal.

Los extractos obtenidos, luego del fraccionamiento con hexano, diclorometano y acetato de etilo, fueron los deseados, donde se demostró la separación correcta de los metabolitos secundarios.

Por medio del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de *Neurolaena lobata*, se logró comprobar la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, terpenos y taninos.

De las pruebas positivas que se obtuvieron en el tamizaje fitoquímico, los metabolitos secundarios que presentan fuerte presencia en las hojas de *Neurolaena lobata* son alcaloides, taninos y terpenos.

En las pruebas de tamizaje fitoquímico, el extracto etéreo fue el que presentó la mayoría de los resultados positivos, lo cual quiere decir que estos componentes presentan un carácter poco polar.

Mediante el tamizaje fitoquímico se logró coincidencia en varias pruebas realizadas a la *Neurolaena lobata*, en comparación con otras plantas que pertenecen a la misma familia (Asteraceae).

De acuerdo con lo encontrado en artículos científicos, las plantas de la familia Asteraceae que se estudiaron, presentan actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*; por lo tanto, hay una alta probabilidad que la *Neurolaena lobata* presente actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.

Al comparar los artículos científicos estudiados en relaciones con las plantas de la familia Asteraceae se puede deducir que la *Neurolaena lobata* es una excelente opción para el tratamiento natural para las caries dentales.

Los tratamientos naturales son una excelente alternativa para este tipo de patologías, ya que se ha comprobado la actividad antibacteriana de diferentes plantas de la misma familia (Asteraceae) contra el microorganismo *Streptococcus mutans* encargado de producir caries.

### **Recomendaciones**

A los estudiantes que deseen continuar con la investigación, pueden realizar pruebas microbiológicas para determinar si *la Neurolaena lobata* presenta actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*.

A los estudiantes que deseen continuar con la investigación, pueden realizarle las pruebas necesarias al enjuague bucal preparado, para que en un futuro pueda salir al mercado, y que sea una alternativa natural para el control de la placa bacteriana.

A los estudiantes de farmacia, que deseen realizar el mismo estudio, que utilicen otras partes de la planta de *Neurolaena lobata*, como tallo o flores.

A la Universidad Internacional de las Américas, fortalecer el uso de los laboratorios de química para que, tanto estudiantes como tesis, tengan más fácil acceso a equipos que ayuden a realizar las pruebas necesarias.

De la misma manera, invertir en un laboratorio de microbiología, con las condiciones mínimas necesarias para realizar este tipo de investigaciones.

A la Universidad Internacional de las Américas, fomentar más este tipo de trabajos en otras materias que se llevan durante la carrera, con ayuda de profesionales en el área, para que, al momento de realizar la tesis, el estudiante tenga buenas bases para hacer un buen trabajo final de graduación.

## REFERENCIAS

- Acosta de la Luz, L.L. & Rodríguez Ferradá, C.A. (2006). Plantas medicinales: bases para su producción sostenible.
- Aguirre Fernández, M.E. (2013). Estudio comparativo de agentes químicos utilizados para la desinfección de cepillos dentales. (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2013).
- Amarise, C. *et al.* (2002). Análisis morfoestructural con microscopía óptica y electrónica de trasmisión del esmalte dentario humano en superficies oclusales. *Acta Odontol. Venez.*;40(1):4-8.
- Ascacio-Valdés, J.A., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar-González, C. (2013). Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(2), 36-40.
- Avello Chamorro, Z.C. (2016). Determinación del contenido de taninos y evaluación de la disminución del infiltrado celular de distintos genotipos de *Ugni Molinae Turcz.*
- Ávila, L., Baquero, E., Viña, A. & Murillo, E. (2006). Antibacterial activity of *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (ASTERACEAE) against *Staphylococcus aureus*. *Vitae*, 13(1), 55-60.
- Ballester N. (2014). Agentes antimicrobianos alternativos de origen natural con acción inhibitoria de *S. mutans* como mecanismo de desinfección de las preparaciones cavitarias dentales. Recuperado de: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2149/Cosco\\_rd.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2149/Cosco_rd.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Baran, E.J. (1995). "Química Bioorgánica". Madrid: McGraw-Hill.

- Blanco, J. B., Jerez, M.A.B., Paneca, M.R., de la Torre, M.H., Laffite, O.C. & Sánchez, R. T. (2005). Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la Planta de Morinda Royoc L. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36.
- Bordas, J., Flores, M., García, M., Ródenas, I. & Martínez, C. (s.f.). Patología bucal. Tratado de Geriátrica para residentes. (s.d.)
- Bosch Robaina, R., Rubio Alonso, M. & García Hoyos, F. (2012). Conocimientos sobre salud bucodental y evaluación de higiene oral antes y después de una intervención educativa en niños de 9-10 años. *Avances en Odontostomatología*, 28(1), 17-23.  
HYPERLINK "<http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v28n1/original2.pdf>"  
<http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v28n1/original2.pdf>
- Carrillo, C. (2013). Diagnóstico de lesiones incipientes de caries. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2010/od101d.pdf>
- Chinchilla-Carmona, M., Valerio-Campos, I., Sánchez-Porras, R., Bagnarello-Madrigal, V., Martínez-Esquivel, L., González-Paniagua, Alpízar-Cordero, J. & Rodríguez-Chaves, D. (2014). Actividad contra *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de plantas en una reserva biológica de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 62(3), 1229-1240. Recuperado de: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442014000300031&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442014000300031&script=sci_arttext)
- Chonate Urtecho, C.M. & Figueroa Neyra, V.H. (2011). Identificación de metabolitos secundarios y cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) por espectrofotometría uv-vis en *artemisia absinthium* L.(asteraceae) “ajenjo”. (s.d.)
- Colina. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E. Sm.) I.M. Johnst” de la zona de Yuca (Cusco). Recuperado de: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7121/Colina\\_ra.pdf?sequence=1](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7121/Colina_ra.pdf?sequence=1).

- Condori Mamani, D. (2015). Desarrollo de una formulación de colutorio a base de extracto acuoso atomizado de la vaina de *Caesalpinia spinosa* Molina Kuntze "tara". Ayacucho 2014. (s.d.)
- De Luca, V. & St Pierre, B. (2000). *Trends Plant. Sci.*, 5, 168-173. (s.d.)
- Dieseldorff, N.G. (2007). Establecimiento de los patrones de identidad farmacognóstica de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass a partir de las características anatómicas de seis poblaciones silvestres. (s.d.)
- Domínguez, A. Catedrático de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. (octubre de 2008). *Revista Estar bien*, Edición N° 8, (71) (s.d.)
- Duque de Estrada J, Pérez J.A. & Hidalgo I. (enero-marzo de 2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev. Cub. Estomatología*. 43(1).
- Enrile de Rojas, F. J. & Santos-Aleman, A. (2005). Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. *Rcoe*, 10(4), 445-452. (s.d.)
- García Martínez, E.M., Fernández Segovia, I. & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. (s.d.)
- García, A.L.J. & Cambroner, L.B. (2019). Importancia cultural de la flora para especialistas populares en Cedral y Corazón de Jesús. Zona de amortiguamiento. Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes. *Pensamiento Actual*, 19(32), 62-77. Recuperado de: [Hyperlink "https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/pensamiento-actual/article/view/37876"](https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/pensamiento-actual/article/view/37876)  
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/pensamiento-actual/article/view/37876>
- García, B. (2012). Extracción líquido-líquido. Separación, purificación e identificación de mezclas binarias de especies orgánicas desconocidas. Cromatografía de capa fina. (s.d.)
- García, P., Caridad M., Nguyen K.B. & Nguyen B.T. (2009). Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L., y *Morinda citrifolia* L. *Rev. Cubana Plant. Med.* 14 (2), 1-7.

- Garritz, A. (2001). Tú y la química. Editorial El Contexto (s.d.)
- Gianna, V. (2013). Extracción, cuantificación y purificación de saponinas de semilla de *Chenopodium quinoa* Willd provenientes del noroeste argentino. (s.d.)
- González, M.G., Escalante, C. & Oreiro, C.D. (2007). Antipyretic effect of the aqueous extract obtained from leaves of *Neurolaena lobata* (Asteraceae) on a pyretic model induced by brewer's yeast. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 1(1), 20-27. Recuperado de: [Hyperlink "https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/medica/article/view/7870"](https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/medica/article/view/7870)  
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/medica/article/view/7870>
- Gratti, A., Feijóo, M.S., Barrientos, E.A., Peneff, R.B. & Laztra, E. (2014). Caracteres anatómicos, morfofuncionales y químicos de *Senecio subpanduratus* (Asteraceae). *Dominguezia*, 30(1), 42-46. (s.d.)
- Hernández Castillo, J.R. & Pardo Ruíz, J.D. (2015). *Estudio monográfico del uso y aplicación de productos naturales en la industria cosmética natural y ecológica* (Bachelor's thesis). Recuperado de: [Hyperlink "https://repository.udca.edu.co/handle/11158/387"](https://repository.udca.edu.co/handle/11158/387)  
<https://repository.udca.edu.co/handle/11158/387>
- Hernández, E., Hung, B., Audivert, Y. & Delgado R. (2004). "Usos del extracto acuoso de *Trichilia hirta* en Santiago de Cuba y en el Caribe. Tradición y perspectivas". *Revista de Biología. Ciencias experimentales y de la salud*. Recuperado de: [http:// www. Biología-eninternet.com/default.asp?id=58 & fd=2](http://www.Biología-eninternet.com/default.asp?id=58&fd=2).
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill.
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. & Maeda, N. (2009). Interacciones bacterianas en el desarrollo de biopelículas dentales. *Revista de Investigación Dental*, 88 (11), 982-990. (s.d.)

- Jáuregui Álvarez, G A. (2013). Efecto antibacteriano in vitro del colutorio a base de Matricaria Chamomilla (Manzanilla) a diferentes concentraciones sobre la cepa ATCC 2652263 De Streptococcus Mutans. (s.d.)
- Jiménez, C.I.E., Martínez, E.Y.C. & Fonseca, J.G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 52(2), 73-5.
- Juliano, S., Marcal, Q. & Souza, A. (s.f.). Productos naturales: efecto antinociceptivo en ratones de un extracto hidroalcohólico de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. y sus fracciones orgánicas. (s.d.)
- Kidd, E. & Fejerskov, O. (2003). Dental Caries, the disease and its clinical management. Blackwell Munsgaard. Oxford, UK,3-7.
- Kidd, E. Essentials of dental caries. (2005). The disease and its management. 3a. ed. Oxford University Press, Inc. New York, NY,2-19.
- Kier, L.B. & Tute M.S. (1999). "Principios de química farmacéutica". Aspectos teóricos del diseño de fármacos. (s.d.)
- Lajter, I., Vasas, A., Béni, Z., Forgo, P., Binder, M., Bochkov, V. ... & Hohmann, J. (2014). Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Journal of natural products*, 77(3), 576-582. Recuperado de: [Hyperlink "https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np400834c"](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np400834c)  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np400834c>
- Linossier, A.C. & Valenzuela, C.Y. (2011). Colonización de la cavidad oral por Streptococcus grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Rev. Chil. Infect.*;28(3):230-7.
- López, M. (1992). Demostración de la actividad antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia* y *Malpighia glabra*. Tesis para optar al título de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- López, Malo, A. (2000). La preservación multiobjetivo de alimentos. Efectos de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

- Loyola-Vargas, V.M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L.C., Galaz-Ávalos, R.M. & Moreno-Valenzuela, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 67-94.
- Luyo, A.G.P. (2005). La biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Revista Estomatológica Herediana*, 15(1), 82-85. (s.d.)
- Luyo, A.G.P. (2009). ¿Es la caries dental una enfermedad infecciosa y transmisible? *Revista Estomatológica Herediana*, 19(2), 118-124. Recuperado de: [Hyperlink "https://www.redalyc.org/pdf/4215/421539352008.pdf"](https://www.redalyc.org/pdf/4215/421539352008.pdf)  
<https://www.redalyc.org/pdf/4215/421539352008.pdf>
- Martínez, M.A. (junio de 2001). Saponinas esteroides. *Rev. Universidad de Antioquia*. [online]. (s.d.)
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 17(6), 271-278. (s.d.)
- Marzal Gamarra, C. (2009). Estudio de la mucosa oral en pacientes que emplean colutorios. (s.d.)
- McKinnon, R., Binder, M., Zupkó, I., Afonyushkin, T., Lajter, I., Vasas, A. ... & Frisch, R. (2014). Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass. *Phytomedicine*, 21(12), 1695-1701. Recuperado de: [Hyperlink "https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711314003134"](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711314003134)  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711314003134>
- Molina-Andrade, L. (2014). Estudio de la degradación de antimicrobianos en agua mediante el tratamiento con radiación ultravioleta. (s.d.)
- Montero, J.G.F. (2016). Uso odontológico de propóleos de origen costarricense. *Odontología Vital*, 1(24), 45-54. Recuperado de: [Hyperlink "https://www.scielo.sa.cr/pdf/odov/n24/1659-0775-odov-24-00043.pdf"](https://www.scielo.sa.cr/pdf/odov/n24/1659-0775-odov-24-00043.pdf)  
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/odov/n24/1659-0775-odov-24-00043.pdf>

- Moromi, H. (2002). Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. Lima, Perú: 92-101.
- Muñoz, M. (2000). Higiene bucodental. Pastas dentífricas y enjuagues bucales. (s.d.)
- Nayak, B. S., Ramlogan, S., Rao, A.C. & Maharaj, S. (2014). Neurolaena lobata L. promotes wound healing in Sprague Dawley rats. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 4(2), 106. Recuperado de: [Hyperlink "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137633/"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137633/)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137633/>
- Negrete Soler, E. C. (2012). Diseño y elaboración de un objeto virtual de aprendizaje para el conocimiento del mentol, un terpeno presente en la yerbabuena, y sus aplicaciones a la vida diaria. (Disertación Doctoral. Universidad Nacional de Colombia).
- Núñez, D. & García, L. (2010). Bioquímica de la caries dental. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n2/rhcm04210.pdf>
- Ojeda-Garcés, J.C., Oviedo-García, E. & Salas, L.A. (2013). Streptococcus mutans and dental caries/Streptococcus mutans y caries dental. *CES Odontología*, 26(1), 44. Recuperado de: [Hyperlink "https://search.proquest.com/openview/a1dafcb05d86ee0aa643b19db8b6f3f3/1?pq-origsite=gscholar&cbl=756331"](https://search.proquest.com/openview/a1dafcb05d86ee0aa643b19db8b6f3f3/1?pq-origsite=gscholar&cbl=756331)  
<https://search.proquest.com/openview/a1dafcb05d86ee0aa643b19db8b6f3f3/1?pq-origsite=gscholar&cbl=756331>
- Organizacion Mundial de la Salud (OMS). (24 de setiembre de 2018). *Salud bucodental*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
- Ormeño, E. & Fernández, C. (2012). Los terpenos de las plantas. *Investigación y ciencia*. (s.d.)
- Pacho, L. (2015). Eficacia, seguridad y efectos adversos de los agentes químicos antiplaca. (s.d.)
- Palacios, M. (s.f.). Metabolitos primarios y secundarios, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Recuperado de: [Hyperlink](#)

"[http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA\\_04.pdf](http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA_04.pdf)"[http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA\\_04.pdf](http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA_04.pdf)

- Piminchumo Castañeda, V.H. (2019). Efecto de dos colutorios bucales comerciales a base de extractos naturales sobre el índice de higiene oral en pacientes atendidos en el curso de periodoncia de la Clínica Odontológica de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Sede Trujillo, Perú 2015.
- Quirós, A. (2016). Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de la mora. Recuperado de: [http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3619/1/397\\_33.pdf](http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3619/1/397_33.pdf)
- Quisillo, J. (2013). Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del escobillón rojo. Recuperado de: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/3097/1/56T00409.pdf>.
- Rodríguez, H. (2005). Plantas plaguicidas en Costa Rica. San José de Costa Rica: Editorial Universitaria Nacional de Heredia.
- Rodríguez, I. (2014). 75% de los ticos entre 20 y 49 años descuida salud dental. *La Nación*. Recuperado de: Hyperlink "<https://www.nacion.com/el-pais/salud/75-de-ticos-entre-20-y-49-anos-descuida-salud-dental/HGMR4RV6QRBA3HFNR4NCTRUP2U/story/>" <https://www.nacion.com/el-pais/salud/75-de-ticos-entre-20-y-49-anos-descuida-salud-dental/HGMR4RV6QRBA3HFNR4NCTRUP2U/story/>
- Santana, P.M., León, T.O., Miranda Martínez, M., Payrol, J.A., Ruíz, O. & García, E.L.P. (2013). Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 131-139.
- Schmeller, T. & Wink, M. (1998). En: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*; Roberts, M.F., Wink, M., Eds.; Plenum Press, New York; pp. 435-459.

- Schweizer, H.P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics; FEMS Microbiol. Lett.; 202:1-7. (s.d.)
- Serrano, J. & Herrera, D. (2005). La placa dental como biofilm: cómo actuar. RCOE; 4:431-9.
- Sharma, N.C., Galustians, H.J., Qaqish, J., Charles, C.H., Vincent, J.W. & McGuire, J.A. Eficacia antiplaca y antigingivitis de un enjuague bucal de hexetidina. J. Clin. Periodontol. 2003;30. (s.d.)
- Soto, M. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedente de la región Amazonas. (s.d.)
- Suárez, S. (s.f.). Composición microbiana de las placas dentales. Recuperado de: [Hyperlink "https://microral.wikispaces.com/Microbiolog%C3%ADa+de+las+placas+bacteria"](https://microral.wikispaces.com/Microbiolog%C3%ADa+de+las+placas+bacteria)  
<https://microral.wikispaces.com/Microbiolog%C3%ADa+de+las+placas+bacteria>
- Thakur, M., Melzig, M.F., Fuchs, H. & Weng, A. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. Botanicals: Targets and Therapy 1: 19-29.
- Velásquez Valderrama, Á.M. (2004). Extracción de taninos presentes en el banano verde (s.d.)
- Vélez-Terranova, M., Gaona, R.C. & Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489-499. (s.d.)
- Vitoria Miñana, I. (2011). Promoción de la salud bucodental. *Pediatría Atención Primaria*, 13(51), 435-458. (s.d.)
- Walshe-Roussel, B., Choueiri, C., Saleem, A., Asim, M., Caal, F., Cal, V. ... & Arnason, J.T. (2013). Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass., a Q'eqchi' Maya traditional medicine. *Phytochemistry*, 92, 122-127. Recuperado de: [Hyperlink "https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942213001866"](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942213001866)  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942213001866>

Zapata, J. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. (s.d.)