

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE FARMACIA

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ALCOHÓLICO DE *RUBUS SPP* SOBRE
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

DIANA YASMÍN PINEDA RODRÍGUEZ

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

SAN JOSÉ, COSTA RICA

NOVIEMBRE, 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecer, primero a Dios y a la Virgen, por ser mi fuerza y mi luz en todo momento; a mi familia por la confianza y el amor que siempre me demuestran; a mis profesores por darme todas las herramientas necesarias para el día a día, especialmente al Lic. Javier Alpízar Cordero, por sus consejos, tiempo, paciencia y apoyo en cada proceso de esta investigación.

A mis amigos de la universidad, por permitirme vivir una de las experiencias más lindas, por esas risas y lloradas; definitivamente son una bendición en mi vida y doy infinitas gracias a Dios por ponerlos en mi camino, Róger, Falon, Claudia, Valery, Sofía, Franciny, Melissa, Ariana, Natalia, Felipe y Diego, gracias por definirme la palabra amistad.

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios y a la Virgen, y a las personas más importante en mi vida:
mi mamá, mi papá y mis hermanos.

Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	16
Planteamiento del Problema	16
Hipótesis de Investigación.....	19
Hipótesis Nula	19
Objetivos.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos	20
Justificación	21
Proyecciones	25
Antecedentes.....	25
Antecedentes Históricos	25
Antecedentes Internacionales.	26
Antecedentes Nacionales	29
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	30
Generalidades de la cavidad oral	30
Biofilme dental	33
Variaciones del pH	44
Carie Dental	45
Histopatología de la carie dental.....	45
Características de los agentes antiplaca	50
Especificidad.....	50
Eficacia	50
Sustantividad.....	50

	10
Seguridad	50
Sustancias utilizadas para el control de la placa dental	51
Nivel de ingesta máximo tolerable	55
Plantas medicinales.....	58
Generalidades de la mora.....	58
Clasificación taxonómica.....	58
Producción de mora en Costa Rica	59
Descripción Botánica.....	59
Usos tradicionales	61
Metabolitos secundarios	62
Compuestos polifenólicos de interés en la mora	63
Alcaloides	63
Flavonoides.....	64
Taninos	70
Terpenos	71
Extracto	73
Maceración	73
Destilación a presión reducida (Rotavapor)	74
Extracción con solventes	74
Evaluación de la actividad antimicrobiana	76
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	77
Método Kirby-Bauer.....	78
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	81
Enfoque de la investigación.....	81
Diseño de la investigación	81
Variables	82
Instrumentos y Técnicas	84
Materiales y Equipos usados para los extractos de Rubus spp	84
Tamizaje fitoquímico a los extractos de la mora	85
Pruebas de Sensibilidad Equipos y materiales para las pruebas	85

Reactivos a utilizar	86
Procedimiento	87
Extracciones metabólicas por técnica de maceración de la fruta Rubus spp.....	88
Destilación del extracto	89
Extracción	91
Extracto etéreo	93
Extracto acuoso AQ1	97
Extracto acuoso AQ2	98
Pruebas microbiológicas de los diferentes extractos de Rubus spp.....	103
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y RESULTADOS	103
Obtención de los extractos de la fruta Rubus spp.....	107
Prueba de identificación para el tamizaje Fitoquímico.....	106
Resultados de las pruebas microbiológicas.....	108
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS.	130

Índice de Tablas

Tabla1.Características organolépticas del extracto <i>Rubus spp</i>	104
Tabla2.Resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de <i>Rubus spp</i>	105
Tabla3.Resultados microbiológicos obtenidos en el laboratorio UIA.....	107
Tabla4.Resultados microbiológicos obtenidos en el laboratorio Microlabs.....	111

Índice de cuadros

Cuadro N°1. Distribución de las bacterias en diferentes sitios.....	36
Cuadro N°2. Identificación bioquímica de los grupos Estreptococos orales	38
Cuadro N°3. Propiedades ideales de los agentes antiplaca	51
Cuadro N°4. Dosis recomendadas de fluoruros según rango de edad.....	55
Cuadro N°5. Clasificación taxónomica de la mora	58
Cuadro N°6. Contenido nutricional de la mora	61
Cuadro N°7. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides.....	69
Cuadro N°8. Operacionalización de variables.....	82

Índice de Figuras

Figura N°1. Partes de la cavidad bucal	31
Figura N°2. Estructura de los dientes	31
Figura N°3. Factores de riesgo y su importancia bucodental	33
Figura N°4. Placa dental	34
Figura N°5. Imagen de <i>Streptococcus mutans</i>	37
Figura N°6. La carie dental enfermedad multifactorial.....	39
Figura N°7. Utilización de la sucrosa en diferentes procesos.....	41
Figura N°8. Imagen de dentina teñida para su proceso de evaluación.....	46
Figura N°9. Información sobre el consumo correcto de azúcar	48
Figura N°10. Espectro de los cuidados bucodentales	49
Figura N°11. Estructura química de la molécula de clorhexidina	56
Figura N°12. Desarrollo de la fase de floración	60
Figura N°13. Agrupación de las drupas en las moras.....	60
Figura N°14. Estructura básica de los flavonoides	66
Figura N°15. Estructura, clasificación y fuente de flavonoides.....	65
Figura N°16. Estructura básica de las cumarinas.....	66
Figura N°17. Equipo de destilación por rotavapor.....	71
Figura N°18. Extracción con solventes.....	72
Figura N°19. Siembra con la cepa microbiana	75
Figura N°20. Halos de inhibición por técnica de difusión.....	76
Figura N°21. Mora recolectada para la investigación.....	82
Figura N°22. Gramos totales de mora pesada.....	83
Figura N°23. Material de maceración y equipo para filtración.....	84
Figura N°24. Método de destilación del extracto en el rotavapor.....	85
Figura N°25. Extracto acuoso concentrado de <i>Rubus spp</i>	86

Figura N°26. Extracción líquido-líquido.....	88
Figura N°27. Placa y sistema cromatográfico para identificación.....	92
Figura N°28. Diagrama del tamizaje fitoquímico	95
Figura N°29. Determinación de la masa de extracto acuoso.....	97
Figura N°30. Preparación de placas microbiológicas UIA.....	98
FiguraN°31. Bacteria con asa micológica estéril.....	99
FiguraN°32. Inoculación con turbulencia McFarland.....	99
Figura N°33. Preparación de placas en cámara de flujo laminar.....	102
Figura N°34. Muestra del fruto de mora (<i>Rubus spp</i>)	103
Figura N°35. Volumen del extracto de <i>Rubus spp</i>	104

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

En Costa Rica, según Montero, Ulate & Elías (2011, párr. 1) mencionan que, desde el punto de una investigación clínica epidemiológica de caries dental, no existe, a nivel nacional, ninguna evidencia científica donde se tenga un registro de esta enfermedad por superficie dental; es decir, la historia en los componentes: cariados, perdidos u obturados por superficie (CPOS).

El conocer la realidad por superficie puede permitir redireccionar algunas de las estrategias de promoción y protección de la salud oral, ya que es necesario conocer cuáles piezas dentales y cuáles superficies, son las que más se ven afectadas en la población de Costa Rica. Según la OMS, la caries dental es conocida como la enfermedad crónica más extendida en el mundo, presentando un reto importante en la salud pública. Según esta organización, las enfermedades bucodentales son enfermedades no transmisibles más comunes que afectan a las personas durante toda su vida, presentando una serie de consecuencias como, dolor, molestias continuas, desfiguración, pronunciación e incluso la muerte.

Según algunas estimaciones publicadas de la OMS, en cuanto al estudio sobre la carga mundial de morbilidad 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.

La Federación Dental Internacional, FDI (2015, p. 17), indica cómo los datos muestran que la caries no tratada en dientes permanentes tiene una prevalencia global del 40%. Se estima que esta enfermedad puede ocasionar pérdidas de dientes, y es la undécima enfermedad más prevalente en el mundo.

La prevalencia de caries dental en la población preescolar de Costa Rica, en el 2006, fue del 43,7%, en escolares un 52%, según la encuesta dirigida por el Instituto

Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) 2008-2009. Así mismo, según Lao (2016, p. 23), también los pacientes geriátricos presentan una serie de características que aumentan aún más el riesgo de presentar enfermedades bucodentales.

Según algunos estudios realizados por la OMS, indican algunos países de Asia y el Pacífico, con el cáncer bucal, como uno de los tres principales tipos de cáncer en razón de su incidencia. Los tratamientos dentales para las diferentes afectaciones presentan un costo muy elevado, y representa una media del 5% del gasto total en salud, y el 20% del gasto medio directo en salud, en la mayoría de los países de más altos ingresos.

En la mayoría de países, las demandas de atención de salud bucodental rebasan las capacidades de los sistemas de atención de salud, impactando con mayor fuerza a los países de ingresos bajos y medianos, por desigualdades en lo que respecta a la salud bucodental, por los diferentes grupos de población de todo el mundo y durante todo el ciclo de vida. Las condiciones sociales tienen un fuerte impacto en la salud bucodental, debido al alto costo de los tratamientos requeridos. (FDI, 2015, p. 16).

Enfermedades no transmisibles, una dieta malsana alta en azúcares libres, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol, la mala higiene bucodental, tienen efectos negativos en la salud bucodental, y son factores de riesgo importantes para la reproducción de las enfermedades bucodentales, más comunes e importantes. (FDI, 2015, p. 19).

Por lo que se indica que las enfermedades bucales y, en especial, la prevalencia de caries, constituyen un problema de salud pública, por lo que se quiere enfatizar en la prevención y el diagnóstico adelantado de las patologías bucales. Nuñez & García (2010, p. 159) mencionan que la carie dental se clasifica como una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, que causa la disolución de los minerales pertenecientes a los tejidos duros del diente, afectando estructuras como el esmalte dental, la dentina y el cemento.

La carie es considerada una patología de los padecimientos más frecuentes, por lo que es de interés señalar al *Streptococcus mutans* como el microorganismo cariogénico más

importante. Se considera que esta bacteria 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 que surge, de esta manera, la necesidad de lograr la formulación de sustancias antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans*, que puedan ser utilizadas sin generar altos efectos secundarios. En los últimos años se ha venido experimentando el uso de alternativas a través de hierbas con propiedades medicinales, las cuales están siendo estudiadas científicamente, con el propósito de utilizar distintos tratamientos; esto se atribuye por el contenido fitoquímico presente en el material natural. (Silva & Siqueira, 2000, p. 27).

Las frutas, como las bayas, son muy promovidas por los beneficios que otorgan a la salud. Las del género *Rubus* en especial son caracterizadas por su alta presencia de componentes. (Sánchez, 2014, p. 8). Además de sus características antioxidantes, la mora, como muchas otras plantas, posee actividad antimicrobiana; esto se da por la presencia de compuestos fenólicos contenidos en ella en presencia de los taninos y los flavonoides, pues se ha comprobado un efecto inhibidor en el crecimiento de microorganismos (Sánchez, 2014, p. 14).

Costa Rica, por su amplia biodiversidad, alberga una gran cantidad de especies vegetales. En los últimos años se observa un incremento en las producciones de mora, principalmente *Rubus adenotrichos*; el género *Rubus* se extiende principalmente en las partes más altas del país, donde la mayor extensión del área sembrada se da en la zona de Los Santos, El Guarco y en las partes altas de Pérez Zeledón. (Castro & Cerdas, 2005, p. 11).

Se lograr destacar el efecto antibacteriano, por una determinación *in vitro* del extracto alcohólico de *Rubus spp* sobre *Streptococcus mutans*, comprobando la eficacia de los halos de inhibición producidos por los extractos de la fruta en diferentes porcentajes sobre la bacteria, mediante controles positivos, tales como la clorhexidina y un control negativo

como suero fisiológico. Este análisis se considera importante, dado que los compuestos presentes en la mora atribuyen propiedades antibacterianas, que inhiben las condiciones de un ambiente que promueve la proliferación de los elementos requeridos para su desarrollo.

En razón de lo anterior, es que se plantea la siguiente pregunta de investigación:
¿Existe realmente un efecto antibacteriano de *Rubus Spp* sobre la *Streptococcus mutans*?

Hipótesis de Investigación

El fruto *Rubus spp* tiene efecto antibacteriano ante el *Streptococcus mutans* de manera *in vitro*.

Hipótesis Nula

No tiene el fruto *Rubus spp* efecto antibacteriano ante el *Streptococcus mutans* de manera *in vitro*.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Rubus spp* sobre *Streptococcus mutans*, para reducir la proliferación de las caries, mediante una forma farmacéutica.

Objetivos Específicos

-Determinar la actividad antibacteriana, del extracto rico en flavonoides de *Rubus spp* (mora).

-Comprobar la eficacia *in vitro* de los halos de inhibición producidos por los extractos de *Rubus spp* en diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans*.

-Relacionar la sensibilidad de *Streptococcus mutans* a los extractos acuosos de *Rubus spp*, con un control positivo de clorhexidina al 0.12% y un control negativo de suero fisiológico.

.

Justificación

La OMS define la salud bucodental como:

un estado exento de dolor bucodental o facial crónico, cáncer de la cavidad bucal o la garganta, infección oral y anginas, periodontopatías, caries dental, pérdida de dientes y otras enfermedades y trastornos que limitan la capacidad de una persona para morder, masticar, sonreír y hablar, así como su bienestar psicosocial.

Por esto, es de gran importancia reconocer los diferentes tratamientos para el bienestar bucal, y el desarrollo de nuevas alternativas de naturales.

Implatec (2018, párr. 8) menciona que, en Costa Rica, el descuido de encías y dientes no solo representa un problema en el desarrollo de caries y enfermedades, sino también en la pérdida y daño de piezas dentales cada vez a más temprana edad en la población.

Un estudio epidemiológico de la Caja Costarricense del Seguro Social, en el 2014, señala que los costarricenses entre los 20 y los 49 años tienen una deficiente higiene dental y mayor riesgo de enfermedades en los dientes y encías. Según el coordinador de Odontología de la CCSS, Rolando Meléndez, menciona que los datos extraídos son de un estudio realizado con 51.191 personas de todo el país y de todas las edades, que asistieron a la consulta odontológica en la CCSS. Se contempló que solo el 10% de los adultos mayores tienen su dentadura completa. Esto genera una alarma, que incurre directamente en los menores, ya que no reciben el ejemplo correcto de cómo cuidar la salud bucodental, (Implatec, 2018, párr.10).

Villalobos (2016, p. 42) dice que entre los problemas más frecuentes que se presentan en la cavidad bucal de los costarricenses, se encuentran la pérdida de dientes, el sangrado y movilidad dental. Destaca que el grupo más preocupante y que más llama la atención de los expertos es el de niños de 0 a 5 años. Entre los esfuerzos realizados por el gremio de odontología, es la preparación de un Plan Nacional de Salud Bucodental, que fue expuesto

durante el 2016 a las autoridades del Ministerio de Salud. De esta manera, se permite acceder a las zonas más vulnerables del país.

Sin embargo, a pesar del incremento de alarmas en relación con la salud oral en Costa Rica, la situación en Latinoamérica no es tan diferente. Las características sociales tan desiguales muestran, en el continente, una gran cantidad de contrastes en la salud oral de la población. (Implatec, 2018, párr. 14).

Según Implatec (2018, párr. 16), alrededor de 600 millones de latinoamericanos, que comprenden desde México y el Caribe hasta la Argentina y Chile en el Sur, donde los desarrollos, niveles sociales y económicos son muy diversos, la prevalencia de caries dental y periodontitis afectan un elevado porcentaje de la población. De acuerdo con un artículo publicado por Contreras (2004, p. 6), Brasil es uno de los pocos países latinoamericanos que ha logrado resultados evidentes en la población, al proponer una política de promoción de la salud oral.

Según Contreras (2004, p. 12), en ciertos estudios nacionales de salud oral realizados en España, México, Colombia, Brasil, Argentina y Chile, se incide la prevalencia de periodontitis crónica, y es entre el 30% al 60%. La prevalencia promedio de gingivitis es del 35% en niños, con un rango entre el 30% y el 80%. Para la periodontitis agresiva está entre el 1% y el 3%. Estas cifras merecen una estrategia para la intervención de las enfermedades periodontales en Iberoamérica.

Entre las enfermedades orales más frecuentes en la región, de acuerdo con el mismo artículo, prevalece la caries dental en primer lugar, seguida por la gingivitis y la periodontitis crónica. Estos padecimientos afectan a 3,9 billones de personas, siendo la caries no tratada (35%) la más prevalente globalmente.

Contreras (2004, pp. 25-26) indica que los años de vida perdidos por las afecciones orales adquieren los 15 millones de DALY, e implican una pérdida de 224 años por

100.000 habitantes. Los primordiales indicadores de riesgo, de las enfermedades periodontales son: el nivel socioeconómico, el acceso a la salud, edad, el género, el nivel de escolaridad, y el tabaquismo. Así mismo, se logra destacar la analogía existente con enfermedades crónicas no transmisibles, y por compartir factores de riesgo habituales con ellas, y que a pesar de los esfuerzos del abordaje individual, existe aún una alta prevalencia de estas enfermedades.

El abordaje de este tipo de enfermedades debe orientar el fortalecimiento del nivel primario de salud, promoviendo estilos de vida saludables, hábitos de higiene oral, consejería dietética, el descubrimiento prematuro de la enfermedad, y el correcto uso de antimicrobianos y alternativas complementarias. (Implatec, 2018, párr. 18).

Para explicar el manejo del tratamiento de la caries como enfermedad infecciosa, constará de dos partes fundamentales, donde la primera consiste en la inhibición del agente infeccioso en la placa bacteriana y tejidos dentales afectados, y la segunda parte consiste en la restauración o rehabilitación del diente. Aiepi (2009, p. 12), menciona que:

la placa bacteriana en una película pegajosa del color blanco amarillento está compuesta por bacterias que normalmente habitan en la boca, en presencia de azúcares y almidones estas bacterias forman ácidos que son los que descalcifican y destruyen el esmalte de los dientes produciendo caries. Por lo que es de gran importancia remover de los dientes esta placa al menos dos veces al día por medios mecánicos de limpieza como lo son el uso del hilo dental, el buen cepillado y una dieta no criogénica.

Actualmente, los materiales usados en la restauración poseen una composición química diferente a los que conforman la propia pieza dental. Según la OMS (2016), con fines terapéuticos se utilizan, de elección, ciertos tratamientos preventivos para la carie dental; estos diferentes productos de origen químico son tales como el 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 el desarrollo de

nuevas formas farmacéuticas de origen natural, que generen una eficacia mayor o similar a los productos químicos, y con una disminución de los efectos secundarios.

Al ser la odontología un campo de investigación en constante actualización, es de gran importancia que tanto los profesionales como los estudiantes estén al corriente de las nuevas investigaciones y que, además, sientan la necesidad de contribuir en este campo.

El llevar a cabo una investigación, donde se incluyan habilidades de prácticas de laboratorio, para la obtención de formas farmacéuticas y manejo de cepas microbiológicas, es de gran conveniencia, ya que en el mercado actual son pocos los fármacos naturales que logren alcanzar un efecto en la placa bacteriana.

Sin embargo, recientes investigaciones a 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. (Ballester, 2014, p. 33).

Estudios recientes, elaborados en la planta de la mora y específicamente en su fruto, han arrojado resultados prometedores de la presencia de compuestos con un alto efecto antibacterial, que, de comprobarse, puede convertirse en una atractiva alternativa para la generación de productos que destruyan la placa bacteriana que se desarrolla en los dientes.

En Costa Rica existen grandes áreas de tierra dedicadas al cultivo de la mora, lo cual representa una buena opción de aprovechamiento de un cultivo para la generación de nuevas formas farmacéuticas, que ayuden con el tratamiento de las caries y beneficien a los distintos factores del riesgo, como la mala higiene bucal, los factores sociales, las enfermedades periodontales, los diabéticos, las embarazadas y otros grupos que son más propensos a producir caries, a encontrar diferentes opciones de tratamientos.

Este preámbulo permite estudiar a la mora en comunidades bacterianas específicas,

en este caso *S. mutans*, mediante un determinado ambiente aislado, cultivando la especie, entregando información sobre la diversidad taxonómica y filogenética de esta, obteniendo importantes avances alcanzados, que podrían contribuir a mejorar la comprensión de la enfermedad y alcanzar modificar en el futuro el diagnóstico, prevención, manejo y pronóstico de la caries dental. (Ballesteros, 2014, p. 32).

El propósito de esta investigación es exponer los principales resultados que ha aportado el estudio de *Rubus spp* sobre la diversidad microbiana, aplicado específicamente a la comunidad bacteriana oral.

El realizar una experimentación con extractos de mora agrega un valor a nivel científico, puesto que, en Costa Rica, hasta el momento, no se ha realizado una forma farmacéutica que incluya el extracto de la mora con poder antibacteriano, para tratar las caries, lo que favorece una disminución de la proliferación de la placa bacteriana.

Proyecciones

De las consideraciones del proyecto del presente trabajo de investigación, se puede mencionar:

Se pretende comprobar el efecto antibacteriano del fruto de la mora frente al *Streptococcus mutans*, aportando información a la comunidad científica costarricense, que sirva de apoyo a las futuras generaciones con interés en la investigación.

Antecedentes

Antecedentes Históricos

La mora es un frutal que pertenece a la familia de las Rosáceas; tiene un peso entre los 3 y 12 gramos, y se describe como un fruto agregado compuesto por múltiples drupas,

donde cada una contiene una semilla, según Kaume et al. (2012, p. 23). Su origen se encuentra en las regiones templadas de Eurasia y América del Norte; sin embargo, el género *Rubus* se ha expandido en las tierras altas de los trópicos, generalmente entre los 1700 y 3000 m.s.n.m. En Costa Rica se reconocen tres variedades silvestres, y se les clasifica de mayor a menor grado de importancia en: “Vino”, “Negrita” y “Caballo”. La Zona de Los Santos es la zona que cuenta con la mayor área productora del país, donde se caracteriza esta fruta con grandes actividades biológicas, incluyendo antibacterianas y antivirales. (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1992, p. 15).

La actividad antibacteriana del género *Rubus* fue evidenciada en la especie *Rubus pinfaensis*. Richards, en 1994, determinó la presencia de 5 tipos diferentes de componentes que demostraban actividad frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Según Flores (2014, p. 3), desde ese momento se comenzaron estudios del efecto inhibitorio de muchas especies del género.

Antecedentes Internacionales.

Según Moreno et al. (2011), en su estudio transversal y descriptivo sobre el empleo de la fitoterapia como uso en enfermedades periodontales en el campo de la odontología, los datos, mediante entrevistas y encuestas, revelaron que una gran cantidad de odontólogos utilizan, como ayuda alternativa, productos no artificiales, donde el paciente pueda continuar con el tratamiento desde su casa, ya que son de fácil acceso, eficaces y de bajo costo, que se pueden extraer de manera natural, o bien en una farmacia.

La mayoría de las alternativas eran la manzanilla, tilo, guayaba y el llantén; esto relacionado con la presencia de metabolitos secundarios, que otorgan grandes beneficios en la salud. Sin embargo, esto permite considerar que otras plantas pueden ser aprovechadas por los profesionales de la salud, debido a su abundancia en la naturaleza y, así, logrando obtener la innovación de tratamientos dentales.

Moreno (2015) menciona que las características fisicoquímicas de los frutos y

plantas se ven variadas por las condiciones climáticas y manejos agronómicos de la zona, que pueden alterar los metabolitos presentes. En el estudio “Caracterización de parámetros fisicoquímicos en frutos de mora (*Rubus alpinus* Macfad)” logró identificar los parámetros fisicoquímicos de la mora; el primer factor correspondió a las fincas de cultivo y el segundo a los grados de madurez. Se midieron las variables pH, sólidos solubles totales, acidez total titulable, índice de madurez, firmeza, diámetro y longitud del fruto.

Tradicionalmente, los extractos del género *Rubus* se han utilizado con distintos propósitos terapéuticos. Por ejemplo, las hojas han sido utilizadas por sus propiedades antiarreicas, antiinflamatorias e hipoglicémicas, para tratar la fiebre, diabetes y dolor menstrual. Mientras que su fruto es considerado un alimento nutritivo y saludable, debido a su alto contenido de antioxidantes como compuestos fenólicos, vitamina C, carotenoides, entre otros. Estos antioxidantes juegan un papel importante, ya que inhiben y eliminan los radicales libres, proporcionando protección contra infecciones y enfermedades degenerativas como el cáncer. (Grabek-Lejko & Wojtowicz, 2014).

Se tiene que, los extractos del fruto, en un estudio realizado por Sánchez (2014), confirmaron la efectiva antimicrobiana del género *Rubus* en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* por parte de flavonoles y flavonas encontrados en el *Rubus spp.* Igualmente, extractos de plantas altamente concentradas en taninos presentan fuerte efecto antimicrobiano sobre *E. coli*, *Micrococcus luteus* y *S. aureus*.

Así mismo, Soto (2014) evaluó, en el estudio del “Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del *Zea Mays* L. (maíz morado), *Rubus glaucus* (mora andina); *Opuntia soherensii* (ayrampo) y diseño de un gel de limpieza cutánea”. Con el objetivo de obtener un gel de limpieza con ciertas características antibacterianas, obtuvo una inhibición del extracto acuoso de *R. glaucus* sobre *S. aureus* con tamaños de halos de 14 mm y 16.6 mm para concentraciones de 100 mg/mL y 200 mg/mL.

Mientras que para el extracto etanólico de esta fruta se obtuvieron halos con tamaños de 12.3 mm, 14.6 mm, 18 mm y 20.3 mm para concentraciones de 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL respectivamente. Esta fruta no solo presentó inhibición

sobre *S. aureus*, sino también sobre especies como *E. coli* y *P. aeruginosa*, tanto en extracto etanólico como acuoso, por lo que se pretende investigar el efecto antimicrobiano de *Rubus* en la bacteria criogénicas como *S. mutans*, ya que distintos estudios con diferentes componentes naturales presentan un efecto antibacteriano referente a esta bacteria.

Según Hurtado (2013) en su artículo sobre la “Actividad antibacteriana de *Pelargonium peltatum*. sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* frente a la clorhexidina”, se evidencia una comparación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso obtenido de las hojas del geranio sobre el *Streptococcus mutans*, para lo cual se realizó por el método de difusión en agar, con 6 concentraciones distintas del extracto acuoso, y así comparar la actividad frente al colutorio clorhexidina.

El resultado que se obtuvo, de ello, fue la más alta actividad antibacteriana con la concentración de 400 mg/mL y la más baja en la de 25 mg/mL del extracto acuoso, sobre las tres especies de *Streptococcus*, en comparación con la clorhexidina con un efecto similar concentraciones de 200 mg/mL, por lo que este estudio concluyó que el extracto tiene actividad antibacteriana, debido a la presencia de polifenoles como: flavonoides, taninos, esteroides, antocianinas y saponinas.

Así mismo, Salgado (2017), en el “Efecto antimicrobiano de *Psidium guajava* (guayaba) sobre cepas de *streptococcus mutans*, estudio *in vitro*” destaca el efecto antimicrobiano que se da por la presencia de flavonoides en la composición química de *Psidium guajava*, ya que sus componentes tienen un efecto sinérgico, en comparación con cada uno de ellos por separado. Esto se da por la acción de los dos flavonoides y tiene potente actividad antimicrobiana.

La placa dental es un factor etiológico principal para la enfermedad periodontal; la quercetina es uno de los flavonoides que se encuentra en las hojas de *Psidium guajava* y ha mostrado excelentes resultados antibacteriales frente a patógenos causantes de enfermedad periodontal.

Antecedentes Nacionales

Sánchez (2014) realizó un estudio del efecto antimicrobiano *in vitro* del jugo de mora (*Rubus adenotrichos*) y la miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* y *Saccharomyces cerevisiae*, mediante una prueba de difusión en agar. Además, estableció el efecto antimicrobiano combinado del jugo de mora y la miel de abeja durante el almacenamiento de una bebida a base de leche.

En la presente investigación se determinó, por medio de una prueba de difusión en agar, que el jugo de mora posee efecto antimicrobiano *in vitro* sobre *S. Typhimurium* y *S. aureus*, el cual es independiente de la acidez del jugo de mora. También logró demostrar que el jugo de mora no tiene efecto antimicrobiano sobre *L. casei subsp. Rhamnosus* y *S. cerevisiae*.

El estudio del género *Rubus* se ha incrementado, y se ha buscado potenciar su efecto en el estudio de Porras (2012) “Síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano funcionalizadas con extracto de la mora (*Rubus glaucus*) y su evaluación preliminar como agentes antimicrobianos”.

Buscó determinar el efecto bacteriostático de las nanopartículas de quitosano funcionalizadas con agentes antioxidantes de diferentes extractos de frutas tropicales. En la síntesis y caracterización de nanopartículas de quitosano funcionalizadas se manipulan variables experimentales para obtener distintas concentraciones, y otros parámetros que presenten este efecto en diferentes bacterias. Las frutas evaluadas en esta investigación presentaron compuestos fenólicos y una actividad antimicrobiana gram positivas en *S. aureus*, *E. Faecalis* y *B. subtilis* y las gram negativas *S. marcescens*, determinando porcentajes de inhibición del 10% al 60%.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Generalidades de la cavidad oral

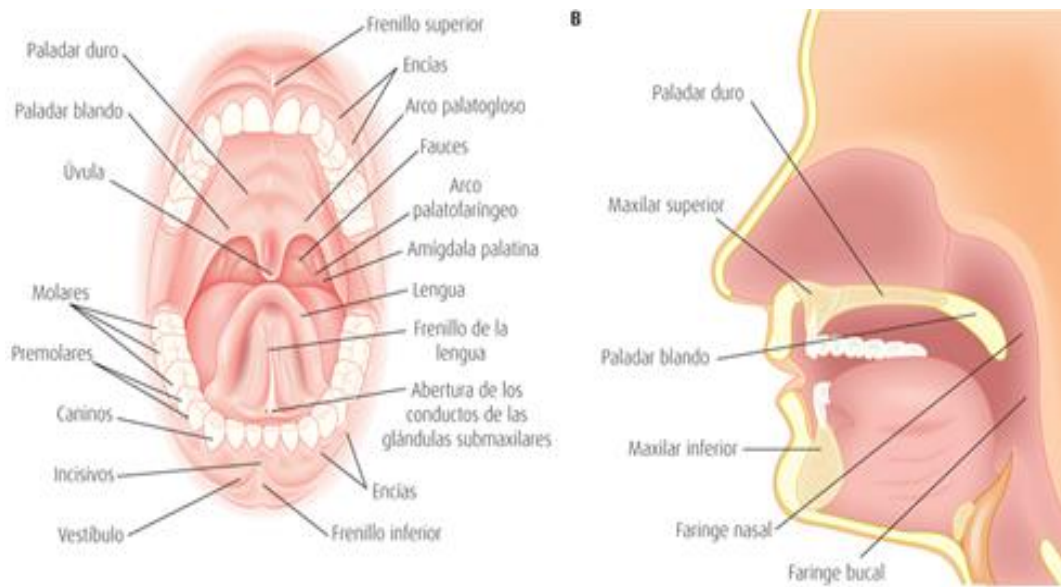
El buen desempeño de la boca juega un papel de gran importancia en la vida y salud de todo ser humano; es por esto que se debe cuidar para que cumpla correctamente con todas sus funciones. La boca está formada por los labios superior e inferiores, mejillas, dientes, muelas, encías, lengua, paladar; también posee una estructura formada por los maxilares superior e inferior, llamada mandíbula, que permite articular. (Véase la figura 1). (Aiepi, 2009, párr. 18).

La boca cuenta con diferentes funciones, desde la digestiva, donde inicia el proceso de la preparación de los alimentos; para que esta se cumpla de la mejor forma, necesita de una dentadura completa y sana, de la misma manera, para una correcta pronunciación de las palabras, depende de un buen estado. (Portalfarma, 2014, p. 8). Además, a nivel psicológico, la apariencia de una dentadura sana juega un papel fundamental, por lo que es de gran importancia mantener las estructuras de las piezas dentales en buenas condiciones. (Aiepi, 2009, párr. 34).

La estructura de los dientes está conformada por diferentes tipos de tejidos duros y un tejido blando en el centro: esmalte, dentina, cemento y pulpa dentaria. Los dientes se disponen en forma de arco y se mantienen en posición gracias al periodonto, el que está protegido por la encía. El diente contiene dos porciones: corona y raíz, donde la dentina está presente, tanto en la raíz como en la corona, y lleva en su espesor la pulpa dentaria, que se ubica en una cavidad central, (Véase la figura 2). (Portalfarma, 2014, p. 10).

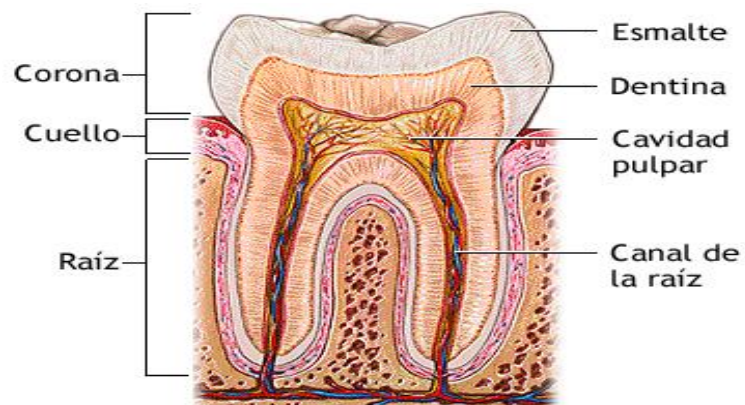
El espesor del esmalte varía en las diferentes zonas de las piezas; se va adelgazando a medida que se acerca a la línea cervical y al cemento. En algunos casos, a estos niveles produce líneas de exposición dentinaria, quedando protegida solamente por la encía, haciendo que sea un punto débil que facilita la formación de caries. (Portalfarma, 2014, p. 12).

Figura N° 1. Partes de la cavidad bucal



Fuente: Texto Atlas de Histología, Biología celular y Tisular (2016).

Figura N° 2. Estructura de los dientes



Fuente: A.D.A.M. Editorial Team (2018).

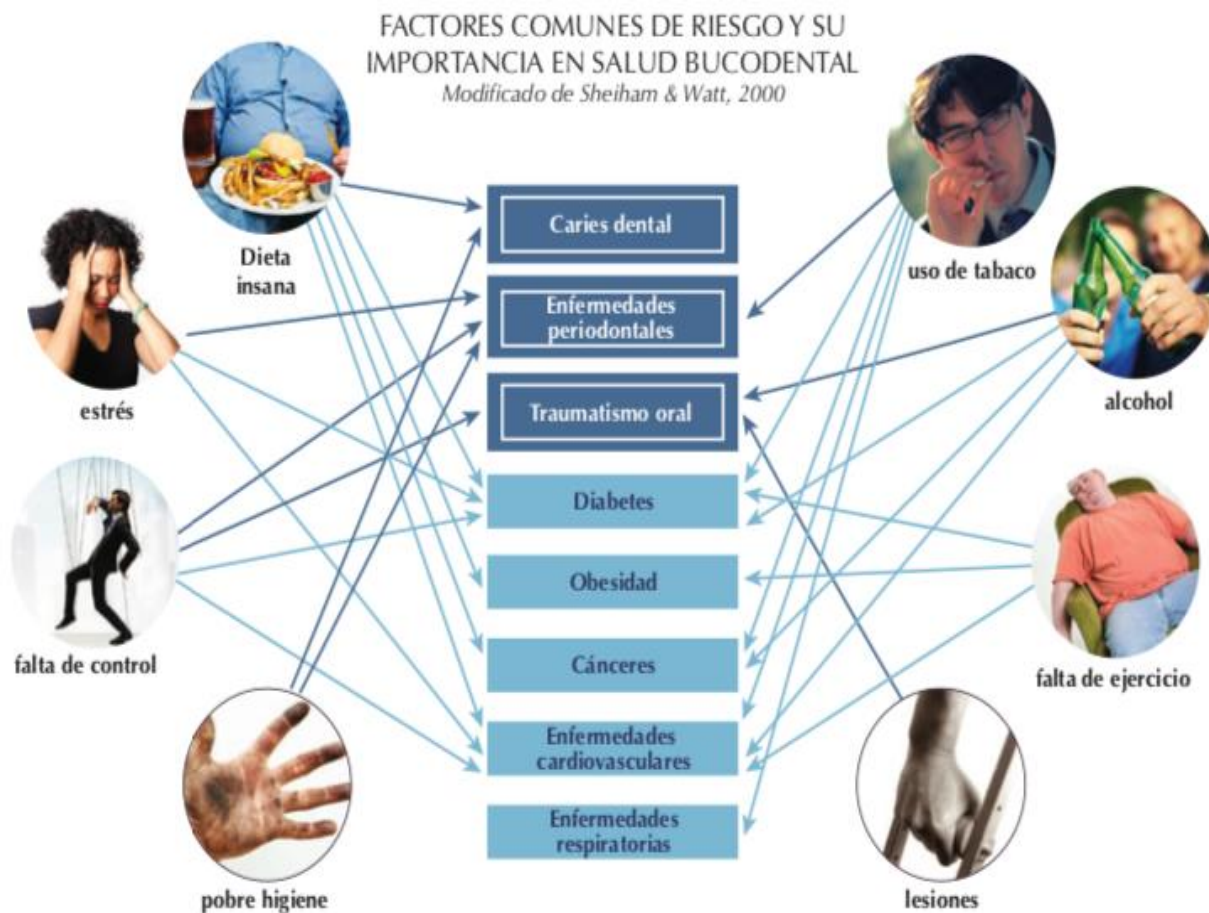
La salud bucodental va más allá de una salud dental o una sonrisa radiante, como menciona FDI (2015, p. 20):

La boca es el espejo del cuerpo y con frecuencia se refleja signos de enfermedades sistémicas ya que algunas lesiones orales pueden ser el primer signo de la infección por VIH, muchas enfermedades sistémicas incrementan el riesgo de enfermedades bucodentales, como son las enfermedades cardiovasculares, cánceres, diabetes y enfermedades respiratorias. Estos factores de riesgo incluyen una dieta poco saludable caracterizada por ser alta en azúcares, consumo de tabaco y alcohol. La estrecha relación entre salud bucodental y salud general así como su impacto en la salud individual y en la calidad de vida, permite una integración de la salud bucodental en la salud general.

Sin embargo, las enfermedades bucodentales cuentan como un gran reto en la salud pública, ya que muchas veces pueden no ser detectadas o por medio de la población han sido aceptadas como una consecuencia inevitable de la vida y el envejecimiento. Si bien se sabe que existe una alta probabilidad de que las enfermedades bucodentales no son inevitables, ya que pueden ser prevenidas a través de métodos sencillos y efectivos, estas medidas se pueden ejercer en cualquier etapa de la vida, tanto a nivel individual como poblacional. (Véase la figura.3). (FDI,2015, p. 41).

Distintos procesos bacterianos que se llevan a cabo en las superficies dentales originan el biofilme dental, que se describirá más adelante, el cual pretende ser disminuido o eliminado de las preparaciones cavitarias dentales mediante los desinfectantes, ya que no siempre se logra eliminar de manera mecánica con un buen cepillado de dientes. (Ballesteros, 2014, p. 20).

Figura N° 3. Factores comunes de riesgo y su importancia en la salud bucodental



Fuente: FDI World Dental Federation (2015).

Biofilme dental

Aiepi (2009, párr. 42), define la placa bacteriana como “una película pegajosa de color blanco amarillento”, organizada por los agregados de microorganismos unidos entre sí o a una superficie e impregnados en una sustancia polimérica extracelular auto producida, compitiendo entre ellas por los nutrientes, los sitios de unión, y la posibilidad de sobrevivir, adoptando distintos mecanismos competitivos. (Huang et al., 2011, p. 12).

Ojeda, Oviedo & Salas (2013, p. 4) mencionan que: “La microflora oral es un complejo ecosistema que contiene gran variedad de especies microbianas”. Su composición varía de una persona a otra, entre distintas localizaciones en la cavidad oral, incluso en diferentes posiciones dentro la misma pieza dental. El número de bacterias en placa dental puede alcanzar 10^8 por mg (peso húmedo). (Véase el cuadro1) .

Existen más de 700 especies dentro de la microbiota oral, que se organizan de acuerdo con los diferentes ambientes bucales. Al analizar se pueden aislar varias especies como estreptococos, estafilococos, bacilos y levaduras. Con el aumento en el número de los dientes y con cambios en la dieta se modifican las proporciones de los microorganismos. Cosco. (2010, p. 6).

Figura N° 4 Placa dental



Fuente: Federación Dental Internacional (2005).

Huang et al. (2011, p. 18) mencionan que el biofilme dental cuenta con cuatro etapas de formación: la primera etapa es la que consiste en la unión de una capa delgada constituida por glicoproteínas salivales de un tamaño de 0,1 a 1,0 micrómetros de grueso a

una superficie dental limpia, llamada "formación de la película adquirida". García-Godoy & Hicks (2008, p. 6) mencionan que esta etapa de base acelular posee funciones, como protección contra la desmineralización y la correcta lubricación para la masticación.

García-Godoy & Hicks (2008, p. 6) indican que la unión puede darse por fuerzas de alto rango, como lo son las fuerzas de Van der Waals y las interacciones dipolo-dipolo, por fuerzas de medio rango, como las interacciones hidrofóbicas, y por las fuerzas de bajo rango, como las interacciones electroestáticas, uniones de hidrógeno, uniones covalentes, y las interacciones iónicas y las ácido-base de Lewis.

La película adquirida de base acelular se une a la hidroxiapatita (HAP) por medio de la estaterina, proteínas ricas en mucinas y prolinas de la saliva. Se define la HAP como un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, presente en dientes y huesos, confiriéndoles su dureza. (García & Reyes, 2006, p. 10).

La segunda etapa es la "adhesión inicial". Huang et al. (2011, p. 8) mencionan que es donde algunas bacterias, que se encuentran aisladas, reconocen proteínas de unión en la película adquirida, y se enlazan a esta. Tan pronto como se unen las bacterias, comienzan a liberar sustancias poliméricas extracelulares. Se unen por medio de estructuras llamadas fimbrias y fibrillas. Las principales bacterias son *Streptococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Actinomyces spp*, *Capnocytophaga*, *Veillonella spp* y *Neisseria*. Huang et al. (2011, p. 10).

Posteriormente, se da la "maduración": estas poseen un sitio de unión específico, ya sea de forma directa o indirecta por glicoproteínas salivales, para que futuras colonizadoras reconozcan los polisacáridos o los receptores proteínicos y se unan, como es el caso de la *Treponema spp*, *P. Gingivalis*. El biofilme dental maduro presenta una estructura con poros y canales de agua que suministran a las bacterias nutrientes esenciales. (Huang et al., 2011, p. 12).

La última etapa se conoce como la "dispersión de sus células", que es el abandono de la bacteria o un grupo de ellas a otro sitio, ya sea porque se ve restringida de nutrientes o

porque el hospedero se defiende mediante la fricción de la saliva, tratando de disminuir el incremento. (Huang et al., 2011, p. 14). Ballesterro (2014, p. 14) menciona que: “Un bajo rango de flujo salival es uno de los principales indicadores de aumento en el riesgo de caries dental”.

El biofilme dental reduce el ingreso de agentes antimicrobiano, de enzimas extracelulares y de agentes nocivos. La unión de estos microorganismos permite que se beneficien mutuamente, transfiriendo factores de protección entre las bacterias. (Ballesterro, 2014, p. 14).

Cuadro N°1. Distribución de las bacterias en diferentes sitios de la boca humana

Grupo Bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco
Gingival				
Cocos G+ Facultativos	28.2	44.8	46.2	28.8
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. mitior</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+ anaerobicos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos G- anaerobicos	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+ anaerobicos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos G- facultativos	NDb	3.2	2.3	1.2
Bacilos G- anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Fuente: Hamada Microbiological (1980).

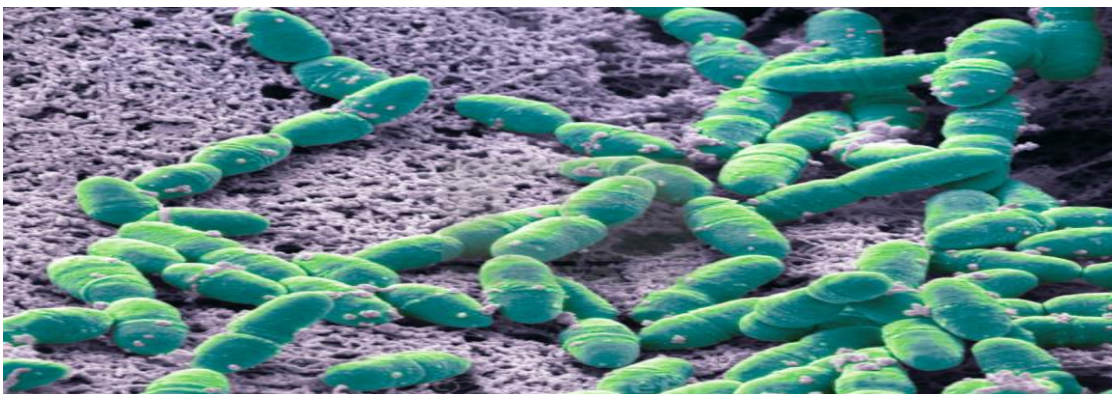
Los estreptococos constituyen el mayor número del total de la población bacteriana en el biofilme. Muchos de los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. Parece que ciertas especies estreptocócicas orales tienen preferencia por colonizar sitios específicos de la boca. *S. sanguis* y *S. mutans* se distinguen por colonizar las superficies de los dientes. (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013, p. 16).

Según Ojeda, Oviedo & Salas (2013, p. 6), mencionan que el grupo *mutans* han sido estudiado por múltiples pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares, que incluyen la hibridación ADN-ADN y secuenciación de genes ARN ribosomales, liderando en el humano el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, ya que se han caracterizado como colonizadores secundarios de la placa dental que cubre la superficie de los dientes y su proceso relacionado con la producción de caries.

Streptococcus mutans

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 *S. 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 N° 5. Imagen de *Streptococcus mutans*



Fuente: Steve Gshmeissner. (2006).

La clasificación de *Streptococos* orales se dio por estudios serológicos, donde se mostró que las cepas del *S. mutans* son heterogéneas; esta clasificación se basó en pruebas bioquímicas y fisiológicas, propuestas en 1974 por Flacklam. El estudio incluyó microorganismos como *S. mutans*, *S. sobrinus*, y *S. dattus*, *S. dacacar*, *S. downel*, *S. ferus*. La diferencia que se da entre el *mutans* y los demás *estreptococos* es por la identificación en la fermentación de carbohidratos, y no por sus características macroscópicas. (Pedraza & Hernández, 2006, párr. 18).

Cuadro N°2. Identificación bioquímica de los grupos *Streptococos* orales

CEPA	Esculina	Inulina	Manitol	Rafinosa	Sorbitol
<i>S. sanguis</i>	-	+	-	-	-
Biotipo 3					
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	+
<i>S. sobrinus</i>	-	+	+	-	-

Fuente: Koneman (2005).

El biofilme dental cuenta con bacterias cariogénicas como *S. mutans*, que se conoce por ser principal acidogénica y acidúrica, transformando carbohidratos de la dieta en ácidos fórmicos, acéticos, propiónicos y lácticos. (García-Godoy & Hicks, 2008). La caries dental es una enfermedad multifactorial, causada por la interacción que existe entre la superficie del diente, el biofilm bacteriano y la presencia de azúcares en la dieta. Las bacterias del biofilm metabolizan los azúcares, produciendo ácidos, los cuales, con el tiempo, van a desmineralizar el esmalte. (FDI, 2015, p. 42).

Ballesteros (2014, p. 18) menciona que “la carie dental inicia cuando la sacarosa que viene de la dieta se expone a la acción de las bacterias acidogénicas y el pH disminuye a un valor menor a 5”. Sin embargo, los sustitutos de azúcar son pocos o nada metabolizados por las bacterias bucales y, si los llegan a metabolizar, se realiza por medio de otras vías que no conducen a la producción de ácidos. (Nuñez & García, 2010, p. 6).

La carie dental, según Struzycka (2014, p. 129): “se desarrolla como resultado de un desequilibrio ecológico en la microbiota oral estable, originando un proceso patológico complejo de origen infeccioso que afecta las estructuras dentarias”. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la carie es una enfermedad causada por la presencia y patogenia del biofilme dental, definiéndola como un proceso patológico y localizado de origen externo, que se inicia después de la erupción dentaria. La pérdida de los minerales ocurre de manera alterna y progresiva.

Los mecanismos de transmisión mayoritariamente son verticales; esto quiere decir que se pueden dar de la madre al niño en un 70%, y de manera horizontal cuando se da a partir de otros miembros de la familia, amigos u otros niños. (García-Godoy & Hicks (2008).

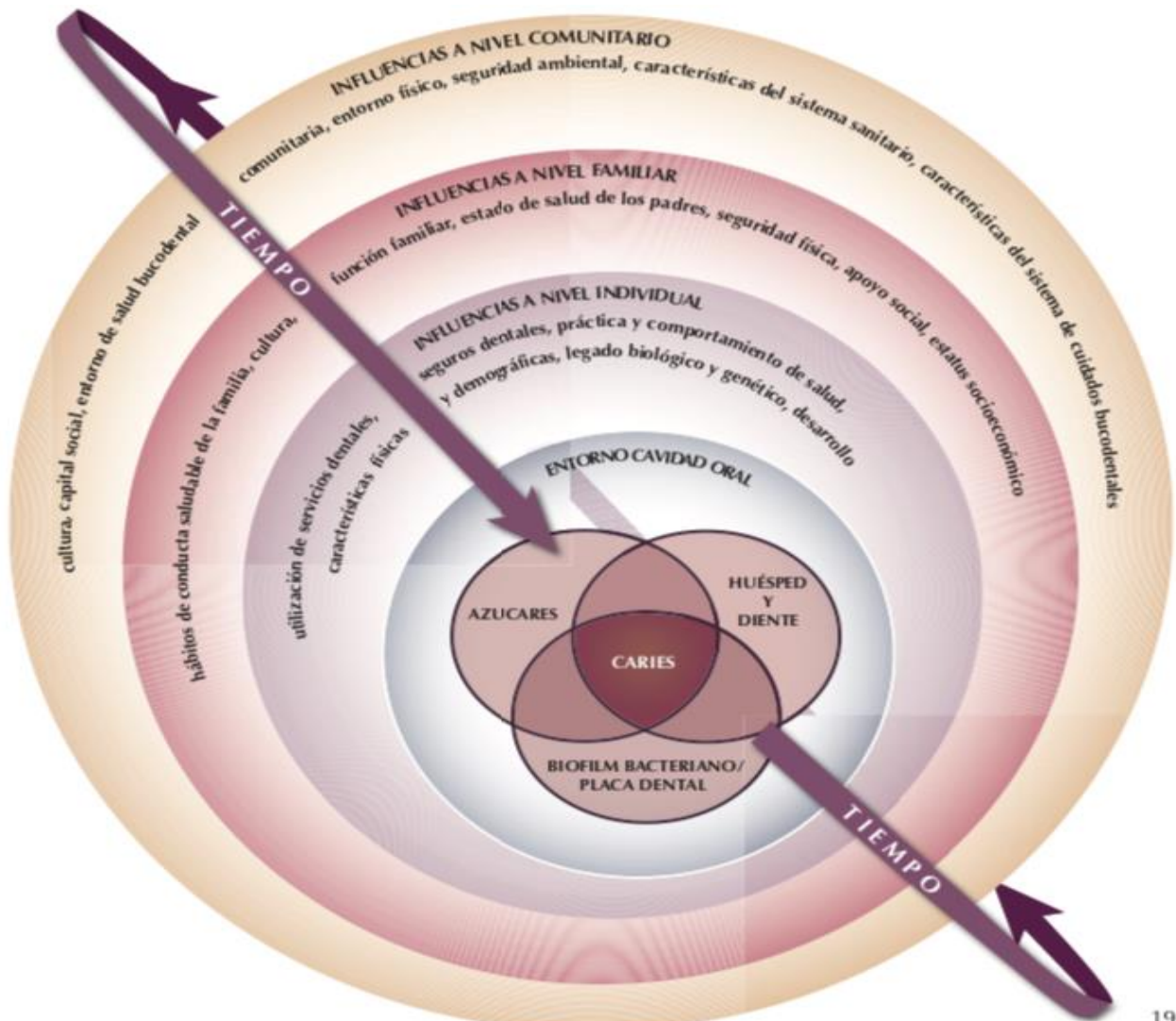
La OMS, en el 2003, indicó que aproximadamente cinco millones de personas padecen de caries; es decir, que aproximadamente el 80% de la población mundial, y otros

estudios plantean que el 99% de la población de Latinoamérica. (González, Martínez, Alfonzo, Rodríguez & Morales, 2009, párr. 6).

La carie dental interacciona en tres factores, los cuales son: el huésped determinado por su higiene bucal presente, entorno físico, la saliva, la dieta, los dientes y su anatomía; el segundo factor es el antes visto, la microflora, que se compone por bacterias, donde los dos grupos de bacterias mayores son la especie *S. mutans* y la de lactobacilos, produciendo ácidos orgánicos y otro factor determinante que se puede incluir en el tiempo, ya que este determina qué tanto van a interaccionar los factores. (Ballester, 2014, p. 20).

La Federación Dental Internacional, en el 2015, menciona que “adicionalmente factores dónde y cómo viven las personas, puede influir el desarrollo de la caries. Esto significa que, si bien el proceso de caries comienza a nivel dentario, el problema no puede resolverse concentrándose solamente en el diente. Requiere también de acciones a nivel comunitario, para alcanzar los amplios determinantes”. (Véase la figura 6).

Figura N° 6. La carie dental enfermedad multifactorial



19

Fuente: FDI (2015).

Productos metabólicos presentes en el proceso de la caries

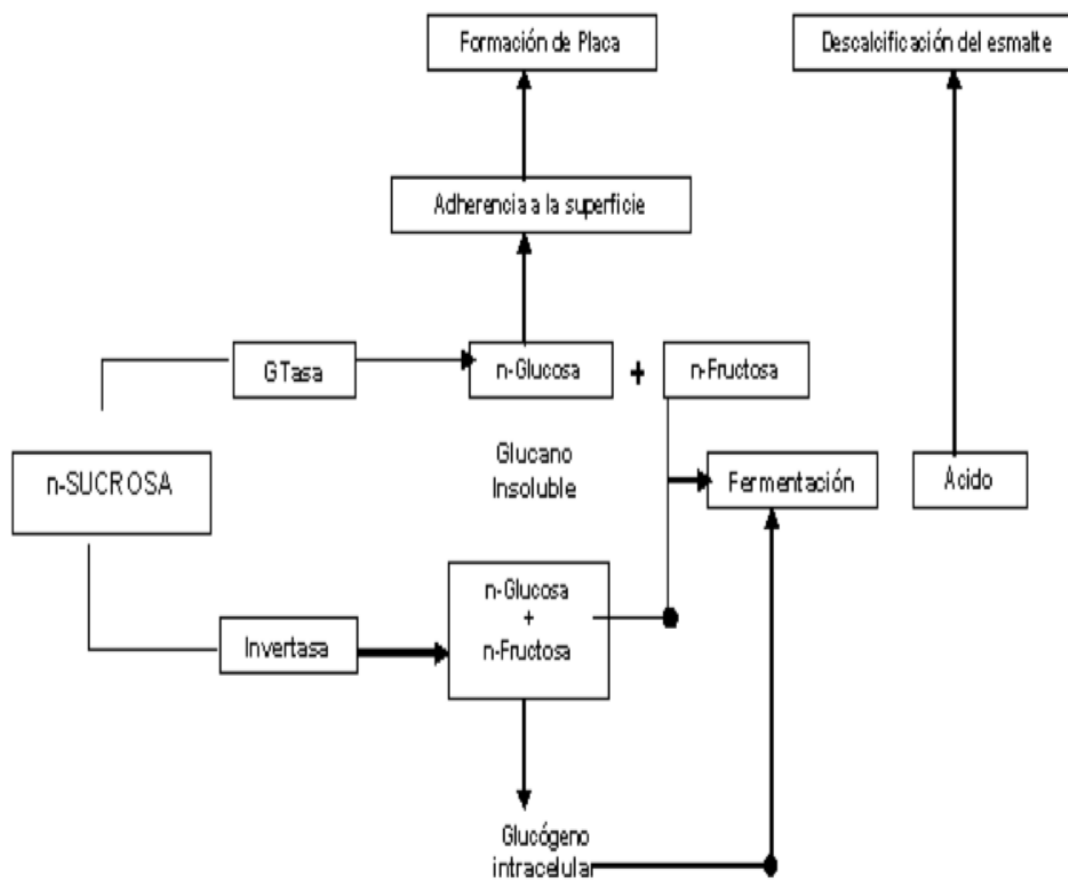
Las bacterias cariogénicas, principalmente *S. mutans*, tienen la capacidad de variar el medio de un pH 7 hasta pH 4.2 a partir de la fermentación de azúcares de la dieta, originando ácido láctico; esto permite la reducción del pH. (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013, párr. 24). Entre el factor de virulencia, la bacteria tiene la capacidad de producir ácido a un pH bajo por su acción de aciduricidad, resistiendo al medio por medio del bombeo de protones H^+ afuera de la célula. (Bascones & Morante, 2006, p. 8).

La síntesis de glucanos y fructanos, realizada por las enzimas glucosiltransferasas (GTF) y fructosiltransferasas (FTF), favorece, en los glucanos insolubles, una adhesión de la bacteria al diente y un suministro de nutrientes de reserva. (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013). Bascones & Morante (2006, p. 10) mencionan que “la catalización de la glucosiltransferasa cataliza la hidrólisis de dos moléculas de sacarosa en sus monosacáridos, constituyendo beta-Dfructuosa y alfaD-glucosa. Las moléculas de glucosa son resultantes, son polimerizadas por enlaces”, los enlaces alfa (1-3), alfa (1-4) o alfa (1-6), seguidamente formando glucanos y dos moléculas de fructosa.

La glucosiltransferasa se secreta en distintas clasificaciones según la solubilidad de su producto. Al producto de la GTF-I y la GTF-SI, con predominio alfa (1-3), se le denomina mutano. Su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar, lo involucra en la adherencia, agregación y acumulación en la placa dental. (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013, párr. 48).

Las bacterias tienen la oportunidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como lo son la dextranasa y la mutanasa. Estas se organizan en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, donde lo hidrolizan y, por este medio, se facilita el paso de los productos de la hidrólisis hacia el interior de la misma (Bascones & Morante, 2006, p. 12), dando los glucanos extracelulares un aporte a las bacterias como fuente de energía. Nuñez & García (2010, p. 8).

Figura N° 7. Utilización de la sucrosa en diferentes procesos



Fuente: Milena & Hernández (2006).

Variaciones del pH

El pH de la boca se ve variado dependiendo del lugar de la boca que se analice; en las piezas dentales esto se ve variado por la accesibilidad de la saliva a los diferentes sitios y en la morfología de cada pieza, ya que no es lo mismo en las piezas posteriores que en los dientes anteriores y en los maxilares. (Ballester, 2014, p. 18).

La disminución 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 (Nuñez y García, 2010, párr. 16). Si la normalización del pH se demora, por consecuencia se prolonga la producción de ácido; esto se debe a que el suministro de glucosa se ve extendido, o bien el poco flujo de saliva limita su capacidad buffer. (Ballester, 2014, p. 18).

Otro responsable del poco aumento del pH, después de la ingesta de azúcares, es la arginina que se presenta en los pequeños péptidos, ya que las bacterias no arginolíticas son aquellas que producen dificultad el aumento del pH; por ejemplo: *S. mutans* y los lactobacilos, mientras que las bacterias arginolíticas producen una base de argina, que permite aumentar el pH considerablemente. (Ballester, 2014, p. 18).

Según la teoría acidófila de Miller, propone que una enorme disminución del pH es consecuencia de la gran cantidad de H^+ , favoreciendo la liberación de los ácidos, debilitando la liberación de OH^- , y al mismo tiempo solubiliza la hidroxiapatita. La conformación de hidroxiapatita se compone de fosfatos terciarios y, cuando se van eliminando los niveles de HAP, se recupera por disociación del fosfato secundario. Cuando el pH es bajo, los fosfatos se encuentran en forma de ácido fosfórico (HF), por la alta presencia de protones. (Nuñez y García, 2010, párr. 44).

Esta teoría de descalcificación ácida requiere que los niveles de pH bajen a un nivel

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 oral baja, mientras que las especies patógenas aumentan, provocan un desarrollo de la lesión cariosa. Ballestero (2014, p. 16) menciona que: "La velocidad con que difunde los ácidos en la capa del esmalte se ve directamente proporcional con el tamaño y el número de los poros que la estructura posea, así como la composición mineral".

Carie Dental

Histopatología de la carie dental

La principal manifestación macroscópica que presenta la carie es una mancha blanca, que es reversible. Si con el tiempo continúa expuesta a altas concentraciones de ácido, puede llegar a una cavitación. El descubrimiento de una carie se puede dar mediante métodos visuales y táctiles. (Ballestero, 2014, p. 14).

Las lesiones visibles se encuentran solo en superficies secas, en el esmalte exterior. Una lesión visible en una zona húmeda puede llegar hasta la dentina. Ballestero (2014, p.14) menciona que estos cambios se presentan por los índices de refracción relativos del esmalte, el aire y el agua:

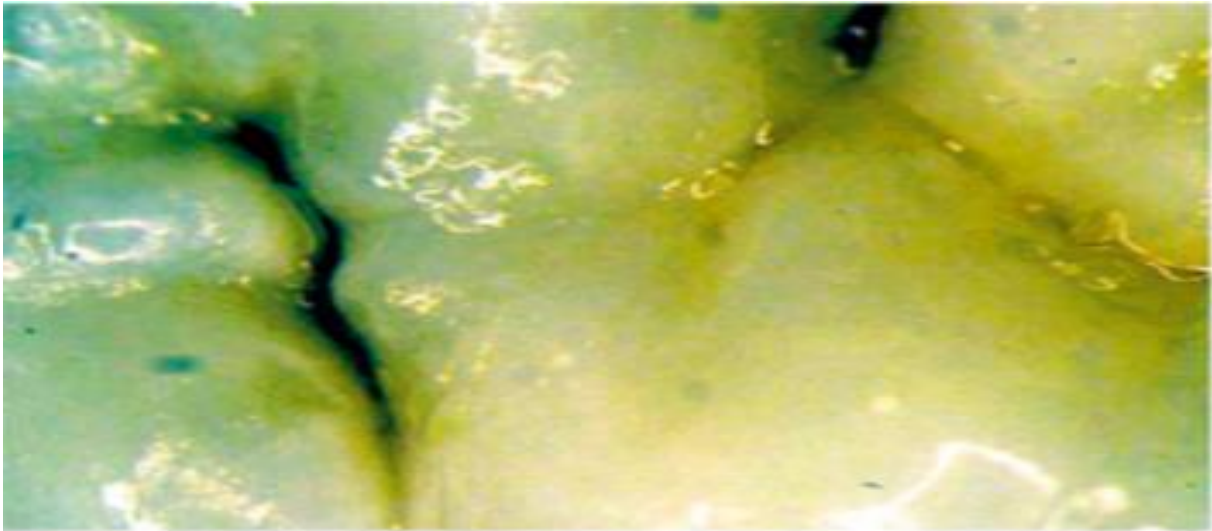
El esmalte por sí mismo tiene un índice de refracción de 1,62. En las superficies ya lesionadas los poros contienen un medio acuoso con un índice de refracción de aproximadamente 1,33 esta diferencia hace que se vea afectada la dispersión de la luz y hace que el daño tenga una apariencia opaca.

Si la superficie está sin humedecer, se sustituye el agua por el aire, presentando un índice de refracción de 1,0, haciendo más evidente la lesión. (Ballestero, 2014, p. 14).

Seguidamente, se propuso durante algunos años el uso de soluciones de pigmentos, como método selectivo para el descubrimiento de una dentina cariada. El más utilizado fue la fucsina. También existen medios radiográficos, que registran la imagen de una estructura

tridimensional en una película. Otro de los principales métodos para la detección de caries se trata de la fluorescencia. (Carrillo, 2010, p. 4).

Figura N° 6. Imagen de dentina teñida para su proceso de evaluación



Fuente: Carrillo (2010).

El tratamiento para las lesiones de caries dental genera un mecanismo de remineralización, donde logra señalar que las caries, en su primer inicio, pueden ser reparadas por la saliva. Cuando se mezclan la aplicación de fluoruro con la remoción del biofilme dental, la saliva permite reendurecer la lesión inicial de la carie; este proceso se logra ver veloz con una reducida cantidad de fluoruro. (Ballesteros, 2014, p.10).

Zero, Fontana, Martínez-Mier, Ferreira-Zandona, Ando, González & Bayne (2009, párr. 48) mencionan, como en un principio, el método más eficaz de controlar las caries en la población es aplicando una cantidad óptima de fluoruro en el agua, no excediendo de los límites por el peligro de generar fluorosis dental; los resultados demostraron una disminución en la prevalencia de caries, tanto en niños como en adultos, por lo que esta investigación condujo al desarrollo del primer programa comunitario de fluoración del

agua, dirigido a la prevención de caries; de este proceso se dio la recomendación de un posible uso en las pastas dentales y la fluoración de la sal.

En 1985, en Costa Rica, por medio del Decreto Ejecutivo 2, se establece como estrategia de salud pública, el Programa Nacional de Fluoruración de la Sal de consumo humano (PNFS), en la cual se fija una concentración de fluoruro de 250 25 gF/ml. En 1994, por medio del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), se modifica a una dosis en 200 25ppm 13, 48. El impacto del PNFS, desde su implementación y hasta 1999, marca un antes y un después en la prevalencia de la caries dental. (Montero et al., 2011, párr. 4).

A partir de los años noventa, con la Reforma del Sector Salud, se innovaron las estrategias de cobertura y la atención de las instituciones prestadoras de servicios en salud a la población costarricense. La Caja Costarricense del Seguro Social asume, como rol, el garantizar los servicios de salud a todos los residentes del país, y el Ministerio de Salud, su representación como ente rector a nivel nacional. Esto establece, en el campo de la Odontología, una responsabilidad mayor: conocer el uso de los servicios de salud bucodental de la población, por ser este un factor de riesgo que recae directamente a la caries dental. Lo manifestado anteriormente es avalado por la Federación Dental Internacional (FDI) y la OMS, en su publicación sobre los cambios en los patrones de la salud oral y sus implicaciones. (Montero et al., 2011, párr. 5).

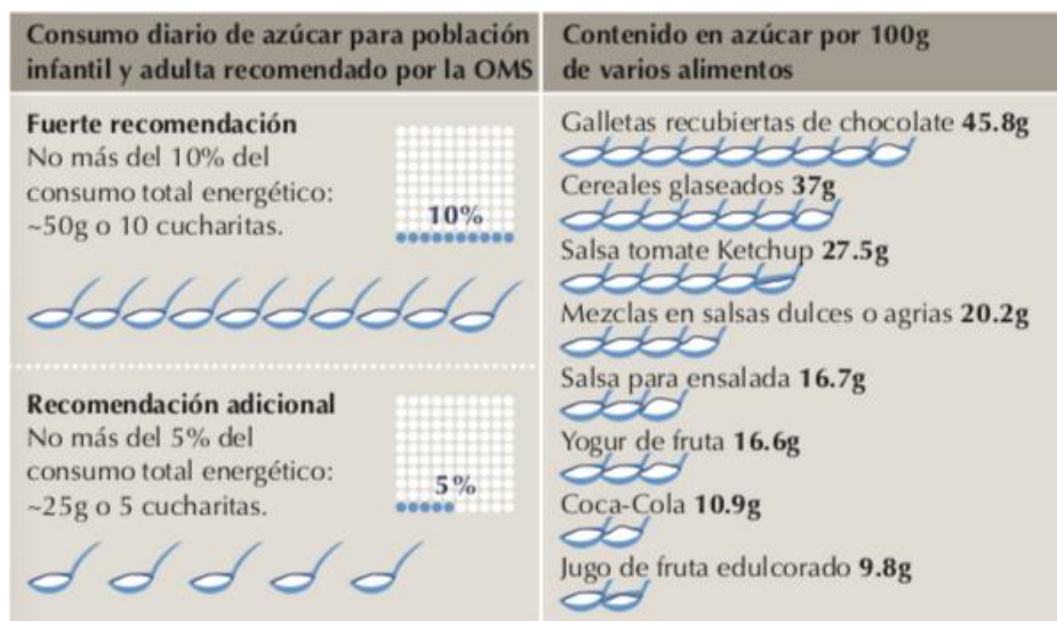
Otro medio de control de caries es la ingesta de carbohidratos; los azúcares añadidos a los alimentos, ya sean los preparados o los azúcares naturales, que pueden estar presentes en la miel, jarabes y jugos, son la principal causa de caries dental en niños y adultos. Si el consumo se realiza con alta frecuencia, aumenta la producción de ácido y aumenta el desarrollo de caries, causando una desmineralización a solo pocos minutos; por lo tanto, cuanto más frecuente sean, hay mayores posibilidades de generar un potencial cariogénico, por lo que es recomendado establecer una dieta con un consumo adecuado y bajo en azúcares, sin olvidar que los azúcares cuentan como una fuente esencial de la ingesta energética diaria. (FDI, 2015, p. 42).

En los últimos 50 años, el consumo de azúcar se ha triplicado, y se considera que siga aumentando. Para poder poner un alto a la creciente epidemia de caries, así como otras

enfermedades, la OMS le indica a la población acortar el consumo diario de azúcares a un 5% o menos del total de energía, aproximadamente a 25 gramos o 5 cucharaditas de azúcar por día. (FDI, 2015, p. 43).

Existen sustitutos de bajo poder cariogénico, como la sucralosa o el xilitol. (Zero et al., 2009). Estos, al no ser fermentados, el pH del biofilme no se verá afectado, llevándose a cabo el proceso de remineralización; asimismo, disminuyendo el conteo de *S. mutans* por la carencia de glucosa. (Ballester, 2014, p. 10).

Figura N° 7. Información sobre el consumo correcto de azúcar

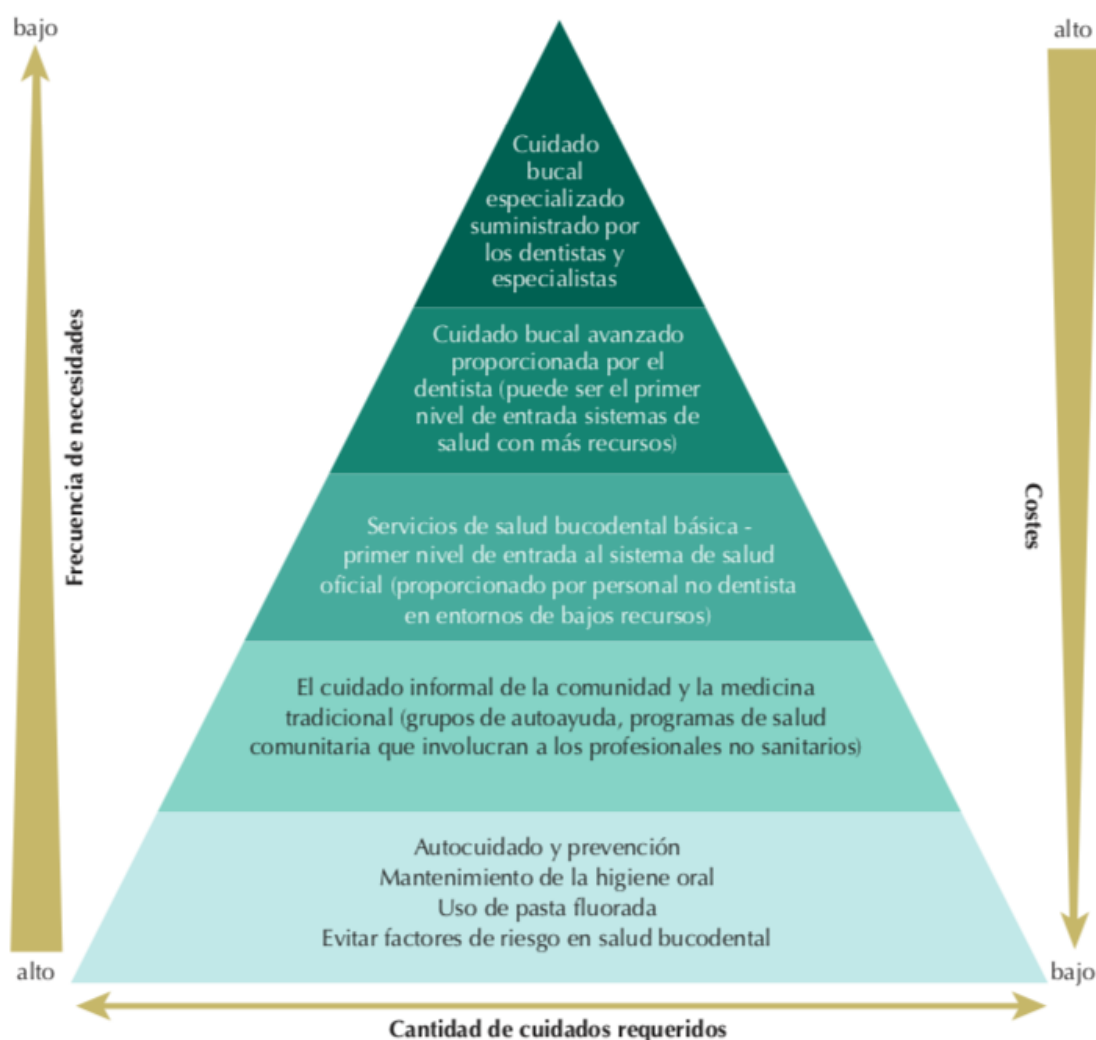


Fuente: FDI (2015).

El FDI (2015, p. 50) menciona que, además, otro de los factores que ayudan a la formación de caries es el abuso del alcohol en la primeras etapas del embarazo, como factor de riesgo en el desarrollo en el feto, causando un daño evidente sobre las células que conforman la boca y los dientes, lo que genera un anormal crecimiento facial, por lo que es importante que los profesionales de la salud bucodental deben ser responsable de los daños que causa el alcohol y proporcionar un consejo adecuado.

Otro mecanismo, no menos importante, es la educación, tanto la brindada con el especialista, como la que se brinda en charlas, giras, consejos a los padres para evitar la alta ingesta de azúcares a los niños, mensajes de cómo realizar un correcto cepillado dental a diario, el uso de medicina tradicional. (Ballesteros, 2014, p. 8). La salud bucodental es generalmente costosa, siendo una de las principales limitantes, por lo que se debe tener en cuenta y abordar las desigualdades, mediante planes de acción de salud pública. FDI, 2015, p. 64).

Figura N° 8. Espectro de los cuidados bucodentales



Fuente: FDI (2015).

Características de los agentes antiplaca

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). Los agentes inhibitorios con mayor eficacia son aquellos donde la acción se mantiene en la boca durante el mayor tiempo posible. (Bascones y Morante, 2006, p. 6). También mencionan las características que deben reflejar los agentes antiplaca:

Especificidad

Existen maneras adicionales de tratar la placa bacteriana, evitando el uso de antibióticos, reservándolos solo para enfermedades sistémicas específicas o infecciones dentales.

Eficacia

La pauta terapéutica es definida por la concentración mínima inhibitoria creada por el antimicrobiano y su acción con las bacterias asociadas a los daños dentales.

Sustantividad

Mide el tiempo de contacto entre el fármaco y el medio dado. Es de gran importancia cuando se trata de infecciones dentales, ya que el tratamiento antimicrobiano requiere tiempo de contacto con el microorganismo, para lograr la inhibición. En la práctica habitual se usan antimicrobianos de segunda generación; esta elección se da por su potencia de acción; son de actividad similar a los de primera generación (antibióticos); en este grupo se localiza la clorhexidina; de baja potencia el fluoruro sódico, y de muy baja potencia el timol y el cetilpiridinio. (Bascones y Morante, 2006, p. 8).

Seguridad

La seguridad de un antimicrobiano viene condicionada por su permeabilidad, donde se vea reflejada una buena absorción en el tracto intestinal, y paso al torrente sanguíneo. Bascones y Morante (2006, p. 8) mencionan que la permeabilidad de la membrana es una

característica de gran importancia para los agentes de peso molecular parcialmente alto, como es la clorhexidina, que se absorben mal y su toxicidad es baja.

Cuadro N°3. Propiedades ideales de los agentes antiplaca

1. Eliminación solo de las bacterias patógenas.

1º Generación:

- Antibióticos
- Derivados del amonio cuaternario
- Compuestos fenólicos
- Fluoruros
- Peróxidos

2º Generación:

- Clorhexidna
- Alexidina

2. Sustantividad
3. No facilitar el desarrollo de bacterias resistentes
4. No ser lesivas para los tejidos bucales a las concentraciones prescritas
5. No manchar los dientes
6. No alterar el gusto
7. Reducir placa bacteriana y gingivitis
8. Precio accesible
9. Facilidad de utilización
10. No desarrollar efectos adversos sobre los dientes

Fuente: Bascones & Morante (2006) Antisépticos orales.

Sustancias utilizadas para el control de la placa dental

Se encuentra una gran variedad de grupos de sustancias utilizadas como método de control de placa dental; dentro de ellas, Bascones & Morante (2006, p. 10) mencionan que

se encuentra el uso de antibióticos, como por ejemplo la penicilina y vancomicina, enzimas, antisépticos bisguanídicos, compuestos de amonio cuaternario, fenoles y aceites, fluoruros, agentes oxidantes, detergentes, alcoholes aminados y productos naturales. A continuación, se mencionarán los métodos más utilizados en la práctica clínica:

Triclosán:

García, Sánchez, Galindo & Cristema (2016, párr. 24) mencionan que este antimicrobiano es usado ampliamente en productos de higiene, belleza y limpieza. Se emplea como compuesto de pastas dentales, que han mostrado ser eficientes en el control y tratamiento de gingivitis. El mecanismo de acción se observa como "bacteriostático a bajas concentraciones y bactericida en altas. Triclosán entra en las células bacterianas afectando la membrana celular y la síntesis citoplásmica del ARN, de los ácidos grasos y de las proteínas. Estudios recientes indican que la actividad antibacteriana se atribuye a que se une al sitio activo de la proteína reductasa transportadora de enoílosacilos".

Como colutorio al 0,2%, genera un efecto inhibitorio moderado de la placa, con un poder antimicrobiano alrededor de cinco horas. Bascones y Morante (2006, p. 12) mencionan que "su acción se ve reforzada por el agregado de citrato de zinc o por el copolímero éter polivinilmetacrílico del ácido maleico. El control antiplaca del Triclosán es muy similar al fluoruro sódico, pero muy inferior a clorhexidina 0,12%. Sin embargo, en la última década, ha tomado relevancia, ya que se han observado efectos citotóxicos, alterando el proceso metabólico celular relacionado con el sistema endocrino, e induciendo la actividad cancerígena *in vitro* y en modelos animales. (García et al., 2016, párr. 32).

La FDA lo clasifica como molécula de la clase III, mientras que la EPA (Environmental Protection Agency), lo registra como pesticida, considerándolo como una sustancia de alto riesgo para la salud humana y el ambiente. De acuerdo con García et al. (2016, párr. 34), mencionan la importancia de la evaluación del uso de Triclosán en el ser humano:

Una vez absorbido el Triclosán (TCS) tiene una distribución sistémica que es detectable en plasma, orina e incluso en la leche materna, ya que una

aproximación de las concentraciones de TCS que puede ingerirse durante el cepillado dental y considerando que la aplicación de pasta dental en el cepillo sea de 1-2 g, generando una ingesta de un 5-40% de la pasta dental usada. Se considera que el tiempo de absorción muestra su mayor pico a las 3h y su tiempo de vida media terminal en plasma es de 19 horas y su excreción por orina es de un promedio de 54% luego de 4 días de ingesta. (p. 45).

Un estudio cohorte de población norteamericana, en la cual se examinaron 2517 muestras de orina, logró determinar una cantidad TCS en un 74.6% del total de las muestras de personas que reportaron el uso de pasta dental con TCS. (García et al., 2016, p. 45). Según Gee (2008, p. 12), en estudios *in vitro*, propusieron que una concentración tan baja como 0.13 µg de TCS en plasma, es semejante a una concentración de 0.1 µg necesaria para inducir la actividad antiandrogénica en células de tumor mamario de ratón.

Por lo que obliga a cuestionarse si el uso diario de TCS puede inducir respuestas dañinas en el ser humano. Al mismo tiempo, la presencia de TCS en leche materna podría inducir lesiones a los recién nacidos que la ingieren, considerando el efecto del TCS en el bloqueo de actividades metabólicas que involucran el desarrollo y crecimiento al inducir cáncer de mama por acumulación en la zona. (García et al., 2016, p. 45).

A pesar de no existir algún estudio clínico que demuestre una relación entre el cáncer y el TCS, no se puede prescindir de los efectos secundarios en ciertas condiciones del TCS, por lo que es de gran importancia reconocer las variantes de formulación de las pastas dentales o los enjuagues.

Fluoruros

El flúor es un elemento de gran importancia y abundancia en la naturaleza, donde se logra encontrar tanto en rocas, tierra, alimentos y el agua, como en los productos elaborados por el hombre, como cremas dentales. Se ha comprobado que las cremas dentales que contienen flúor son un medio eficaz para la reducción de caries a un menor costo. (Acuña, 2013, p. 8).

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 carie, se ha indicado que:

1. Favorece la remineralización: en el exterior de los cristales parcialmente desmineralizados ejercen una función como núcleo para el proceso de remineralización dental.
2. Inhiben 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 *S. mutans*, inhibiendo la enzima enolasa, la cual participa en la captación de azúcares y el desarrollo bacteriano.

Sin embargo, el uso excesivo de flúor durante largos periodos puede producir fluorosis dental o esquelética, (Bernabe, 2016, p. 14). Al principio se trata de una hipomineralización de la superficie del esmalte, del cual se puede propagar a través de todo el espesor, incrementando la seriedad de la condición, produciendo una decoloración de amarillo a marrón, por el incremento de nitrógeno y manganeso contenido, y según la severidad de la corona afectada se cuantifica en el esmalte. (Acuña, 2013, p. 8).

Cuadro N° 4. Dosis recomendadas de fluoruros según rango de edad

Edad	Ingesta adecuada (mg/día)	Nivel de ingesta máximo tolerable (mg/día)
0-6 meses	0,01 mg	0,7 mg
7-12 meses	0,5 mg	0,9 mg
1-3 años	0,7 mg	1,3 mg
4-8 años	1 mg	2,2 mg
9-13 años	2mg	10 mg
14-18 años	3 mg	10 mg
18 años a menos de 70 años	4 mg (Varones) 3mg (mujeres)	10 mg

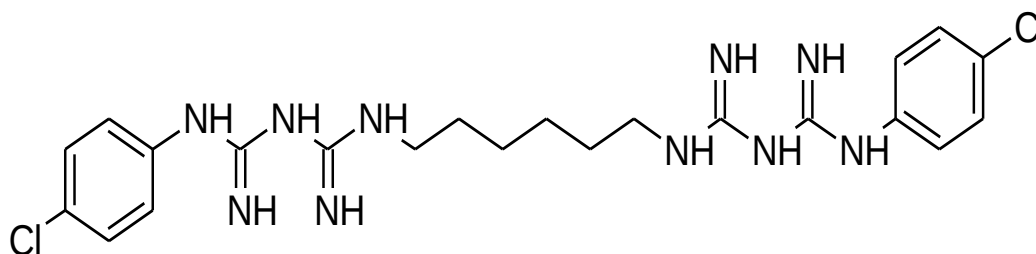
Fuente: Miñana (2012).

Gluconato de clorhexidina

Ballestero (2014, p. 16) menciona que “la clorhexidina se caracteriza por ser una molécula bicatiónica simétrica consistente en dos anillos: cuatro de clorofenil y dos bisguanidas conectadas por una cadena central de decatileno”. Actualmente el gluconato de clorhexidina se distribuye en dos concentraciones, al 0,12% y al 2%, en diferentes formas farmacéuticas, facilitándole al consumidor en su uso, se consigue en gel, colutorio, aerosol, barnices, dentífricos e irrigadores. (Ballestero, 2014, p. 17).

Bascones & Morante (2006, p. 9) mencionan que este compuesto se clasifica como una base fuerte dicatiónica a pH mayor a 3,5, con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno; es esta característica dicatiónica la que permite interacción con los aniones.

Figura N° 9. Estructura química de la molécula de clorhexidina



Fuente: Diomedi (2017).

La clorhexidina fue desarrollada cerca la década de los 40, por medio de Imperial Chemical Industries, en Inglaterra, en un estudio contra la malaria; en ese momento se logró demostrar que tenía un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel, donde su principal uso fue en la medicina y cirugía, tanto para el paciente como para el cirujano. (Bascones & Morante, 2006, p. 9).

Bascones & Morante (2006, p. 9) dicen que, en odontología, comenzó a utilizarse para la desinfección de la boca y endodoncia. El estudio definitivo, que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia, fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día, con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2%, en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y, consecuentemente, el desarrollo de gingivitis.

El gluconato de clorhexidina tiene un efecto de 12 a 24 horas, con lo que desfavorece la colonización bacteriana; por sus propiedades catiónicas logra unirse a la hidroxiapatita del esmalte, a las proteínas salivales, y a la película adquirida, al igual que los componentes aniónicos de la superficie bacteriana; su efecto antimicrobiano permite inhibir microorganismos como *S. Aureus*, *E. Faecalis*, *P. Aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *S. mutans*, (Ballester, 2014, pp. 8-9).

Su mecanismo de acción evita que se dé la formación de una nueva placa, disminuyendo la adsorción de glucoproteínas salivares en la superficie dental, por un bloqueo de los grupos ácidos libres, como los sulfatos, carboxilos y fosfatos, impidiendo que las bacterias logren unirse a la película adquirida ya existente, mediante los grupos negativos de la superficie celular bacteriana (ejemplos: ácidos teicoicos), logrando desorganizar la estructura de la placa bacteriana actual, desplazando el calcio de los grupos sulfato, impidiendo que las bacterias se unan a la película adquirida. (Bascones & Morante, 2006, p. 10).

La clorhexidina que se adsorbe logra liberarse de manera gradual en un tiempo de 8-12 horas en su forma activa; pasadas las 24 horas aún pueden presentarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que retrasa la formación de una colonización bacteriana en el sitio. Su pH neutro, y ligeramente alcalino, se une a las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, al esmalte, a la película cubriendo al diente y liberándose lentamente. La molécula se fija a la mucosa, mediante la unión de los grupos carboxilos ubicados en la capa de la mucina que rodea la mucosa; posteriormente, debido a la segregación de iones de calcio por las glándulas salivares, se logra liberar molécula de clorhexidina lentamente. (Bascones & Morante, 2006, p. 10).

En el presente estudio se tomará, como comparación, el desinfectante de cavidades con base en el gluconato de clorhexidina al 0.12%, dado que es el mayor comercializado para uso común.

Fenoles y aceites esenciales

El más conocido es el Listerine[®], una mezcla de aceite esencial de timol, mentol y eucalipto combinados con metilsalicilato, con un 26,9% de alcohol y con diferentes presentaciones de sabores. El fabricante indica que este producto se debe usar en un enjuague de 20 ml durante 60 segundos dos veces al día, ya que se obtiene una disminución del índice de placa de un 12% mayor, utilizándolo 60 seg que 30 seg. (Bascones y Morante, 2006, p. 10).

Actualmente se buscan productos alternativos y de origen natural para la desinfección de cavidades, que provengan de extractos de plantas y frutos, debido a que algunos extractos ya han sido investigados por sus efectos antimicrobianos, capaces de prevenir la adhesión de bacterias cariogénicas a la superficie dental. (Ballesteros (2014, p. 28).

Plantas medicinales

Generalidades de la mora

Clasificación taxonómica

La mora pertenece al género *Rubus* de la familia de las Rosáceas, fue nombrada por Hartw y descrita por Benth. (Emperatriz, 2018, p. 4). El interés por la mora en el mercado es bastante amplio, por su alto contenido de antocianinas, elagitaninos y compuestos polifenólicos. Se considera que la producción anual de *Rubus* spp es de 154.578 toneladas al año, donde su mayor productor es Norteamérica. (Quirós, 2016, p. 6).

Cuadro N° 5. Clasificación taxonómica de la mora

Reino:	Vegetal
División:	Antofita
Clase:	Dicotiledónea
Subclase:	Arquiclamídea
Orden:	Rosales
Familia:	Rosáceae
Género:	<i>Rubus</i>
Subgénero:	<i>Eubatus</i> (<i>Rubus glaucus</i> Benth) <i>Idaeobatus</i> , <i>Orobatus</i> . Subgéneros más.

Especies	<i>R. glaucus</i> , <i>R. megalococcus</i> , <i>R. adenothallus</i> , <i>R. peruvianus</i> , <i>R. bogotensis</i> , <i>R. adenotrichos</i> , <i>R. urticifolius</i> , <i>R. laciniatus</i> , entre otras.
Nombre científico	<i>Rubus glaucus</i> , <i>rubus spp.</i>
Nombre común	En español se domina como mora o zarzamora.

Fuente: Emperatriz (2018).

Producción de mora en Costa Rica

La mayor área productora de mora se localiza en la zona de Los Santos (Tarrazú, Dota, León Cortés), El Guarco y Pérez Zeledón. La actividad morera emplea un número mayor a 800 familias, que de manera integrada participan en labores que solicita el cultivo. (Retana & Cerdas, 2005, p.16). Según el Consejo Nacional de Producción, en Costa Rica se comercializan 3 variedades de mora: Negrita, Vino y Castilla. (Quirós, 2016, p. 15).

A nivel nacional, las áreas de cultivo han aumentado. El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), junto con el Consejo Nacional de Producción (CNP), laboratorios de la Universidad de Costa Rica y otras instituciones han moldeado el proceso para una mejora en el sistema de cultivo, considerando desde la selección de la semilla y su reproducción *in vitro* hasta el fortalecimiento del manejo de la cosecha y poscosecha, (Retana & Cerdas, 2005, p. 8).

Descripción Botánica

Flor: Retana y Cerdas (2005, p. 15) mencionan que: "Las flores se desarrollan tanto en racimos terminales como laterales. La flor contiene cinco pétalos de color blanco a

violeta o rosado, dependiendo del tipo de mora. Las flores de la mora son hermafroditas y actinomorfas de varios estambres y pistilos”.

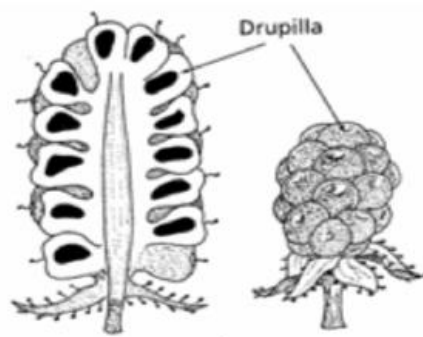
Figura N° 10. Desarrollo de la fase de floración



Fuente: Emperatriz (2018).

Fruto: constituido por el agrupamiento de varias grupas, con una semilla en su interior, su forma se caracteriza por ser redonda o elipsoidal; su color se forma dependiendo de su madurez de un rojo a un negro. (Retana & Cerdas, 2005, p. 15).

Figura N° 11. Agrupación de las drupas en las moras



Fuente: Emperatriz (2018).

Hojas: Retana & Cerdas (2005, p. 15) mencionan que las hojas son trifoliadas y pentafoliadas; su longitud varía de 4 a 8 centímetros, Las hojas también tienen espinas en el envés, a lo largo de la vena central. El color y tamaño varía de acuerdo con el tipo de mora.

Usos tradicionales

Se ha utilizado a escala comercial para la elaboración de frescos, vinos, mermeladas. Según la Universidad de Costa Rica (2000), indica el siguiente valor nutritivo de 100 gramos de jugo de mora:

Cuadro N° 6 Contenido nutricional de la mora

Energía	57 kcal
Fibra dietética	5,30 gramos
Proteínas	1,2 gramos
Grasa	0,6 gramos
Carbohidratos	13,2 total
Cenizas	0,6 gramos
Calcio	34 mg
Magnesio	20 mg
Potasio	196 mg
Fósforo	36 mg
Hierro	2,0 mg
Vitamina C	18 gramos
Vitamina B6	0,06 mg
Ácido fólico	34 mg

Fuente: INCAP-OPS (2000).

Metabolitos secundarios

Una de las características de los seres vivos es la presencia de la actividad metabólica. El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas que ocurren en el interior de la célula; en la célula vegetal este se divide en dos: en el primario y el secundario. (Quispillo, 2013, p. 15).

Se entiende como metabolismo primario a los procesos metabólicos, tales como fotosíntesis, respiración o transporte de solutos; el metabolismo secundario determina la función de la planta con el medio ambiente. Dentro de los metabolitos secundarios principales con propiedades medicinales se describen:

Compuestos polifenólicos de interés en la mora

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica; permite determinar, de manera cualitativa, los principales grupos químicos encontrados en planta o fruto; a partir de esto se logra una orientación o fraccionamiento adecuado para el aislamiento de los extractos de interés; posteriormente, por medio de ensayos, se identifican los grupos fitoquímicos presentes en cada prueba con características cualitativas, debido a que son reacciones de precipitación o cambios de color de los metabolitos secundarios que se están determinando; además, también ser sensibles, reproducibles y de bajo costo. (Quispillo, 2013, p. 15).

Alcaloides

Los alcaloides se caracterizan por ser sustancias presentes en todos los órganos de la planta. A mediados del siglo XX se habían aislado unos 800 alcaloides; este número llegó a aumentar a unas 7000 estructuras, con los avances tecnológicos. (García, 2018, p. 6). Si bien la función de los alcaloides aún no es tan clara en las plantas, existen algunas sugerencias acerca del “rol” de estas sustancias en los vegetales. Arango (2008 p. 6) menciona:

- 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 las planta, en su mayoría de veces ejerciendo 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 alcaloides se basan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio. En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: Wagner, Mayer, Hager, Ehrlich, Dragendorff, entre otros. (García, 2018, p. 7).

En la prueba de Dragendorff, se considera positiva si al colocar el reactivo se observa una formación de un precipitado color anaranjado, en el momento en que la gota del reactivo deslizada por las paredes del tubo de ensayo entra en contacto con la disolución.

Moreno (2015, p. 7) menciona que la presencia de alcaloides y propiedades del fruto dependen de las condiciones medioambientales en las que crece la planta. Se conoce que el contenido y la composición de los metabolitos presentes se pueden diversificar según las condiciones de tipo del suelo, cultivo, zona geográfica, clima, y estado de la planta al momento de la recolección.

Flavonoides

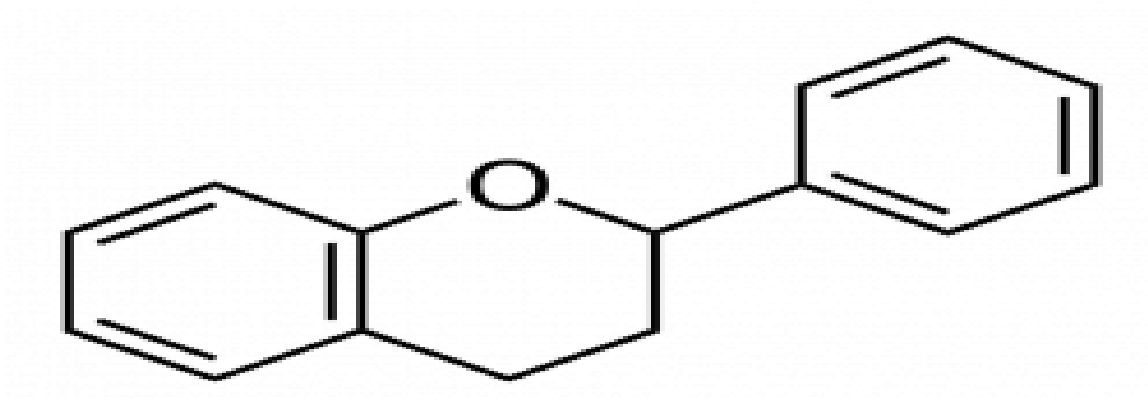
En 1930, Szent-Györdy descubrió los flavonoides, al aislar en la cáscara de limón una sustancia, denominada citrina, capaz de regular la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Los flavonoides en un principio fueron llamados vitamina P. Sin embargo, este

hecho no pudo ser confirmado, y se abandonó esta denominación alrededor de 1950. (Vargas, 2004, p. 10).

Los flavonoides presentan la estructura de benzo- γ -pirano presentes en el reino vegetal, Estos metabolitos son sintetizados en las plantas como resultado del metabolismo secundario, por medio de las vías metabólicas del ácido shikímico y de la ruta del ácido malónico. La síntesis de fenoles en las plantas está involucrada por la vía del ácido shikímico. La condensación presente entre la eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato dan lugar a la síntesis del ácido shikímico y aminoácidos aromáticos, como lo es la fenilalanina, que al ser hidroxilada guía a la síntesis secuencial de chalconas y flavanonas. La modificación de estas da lugar a las flavonas, isoflavonas, dihidoxiflavonoles y flavonoles. (Gutiérrez, 2017, p. 595).

Según su estructura química, los flavonoides presentan dos anillos aromáticos bencénicos, unidos por una cadena de tres átomos de carbono, con una estructura general conocida como C6-C3-C6 y con posibilidad de formar un tercer anillo, conformando diferentes grupos. Estos presentan diversas modificaciones, entre las que se encuentran la hidroxilación, la metilación, la isoprenilación, la dimerización y la glicosilación. Se clasifican en flavanol, antocianidina, flavona, flavanona e isoflavona (Gutiérrez, 2017, p. 596).

Figura N°12 Estructura básica de los flavonoides



Fuente: Ochoa & Ayala (2004).

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 encuentra 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).

Las características biológicas de los flavonoides permiten ser de gran estudio; dentro de sus propiedades farmacológicas poseen componentes antiinflamatorios, antivirales, antibacterianos, antioxidantes, antiagregantes, antihemorrágicos, vasodilatadores, antineoplásicos, antialérgicos y hepatoprotectores. (Reyes, Ubaldo & Araujo, 2012).

Reyes *et al.* (2012, p. 8) mencionan que:

el hombre los consume cotidianamente flavonoides en la dieta ya que están presentes de forma abundante en los vegetales, las frutas rojas como las moras, fresas, zarzamoras (*Vaccinium ssp.*); frutas cítricas (*Citrus ssp.*), el chocolate (*Theobroma cacao*), las nueces, las bebidas derivadas de la uva (*Vitis vinifera*) como el vino tinto, los tes verde y negro (*Camelia sinensis*), así como en otros alimentos.

Cuadro N° 3. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides

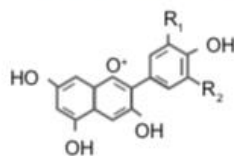
Efectos	Flavonoide
Antineoplásico	quercetina, kaemferol, fisetina
Cardiotónicos	3-metil-quercetina
Disminuyen la fragilidad capilar	rutina, quercetina, naringenina
Antitrombóticas	tangeretina, hesperidina, rutina
Disminución del colesterol	liquiritigenina
Protección y regeneración hepática	silimarina, apigenina
Antiulcéricos	Kaemferol, quercetina
Antimicrobianos	quercetina, baicalina
Antibacterial	crisina, rutina
Antiviral	crisoeriol
Antifúngica	cloroflavonina, apigenina
Antiinflamatorios	hesperidina, luteolina, quercetina
Analgésico	hesperidina
Anticancerígeno	quercetina

Fuente: Reyes (2012).

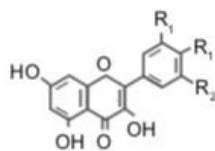
Figura N° 15. Estructura, clasificación y fuente de flavonoides



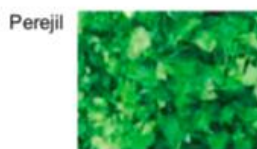
Cebolla
Té verde



R1	R2	R3	Flavonol
OH	OH	H	Catequina
OH	OH	OH	Galocatequina



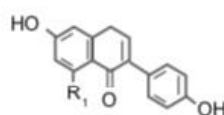
R1	R2	R3	Flavonas
H	OH	H	Apigenina
OH	OH	H	Luteolina



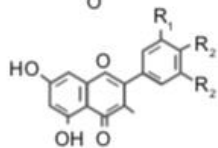
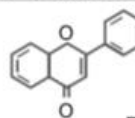
Perejil



Soya
Leguminosas



R2	Isoflavonas
OH	Genisteína
H	Diadzeína



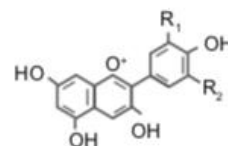
R1	R2	R3	Flavonas
H	OH	H	Narigenina
OH	OH	H	Eriodictiol



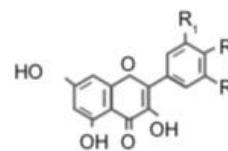
Limones



Bayas



R1	R2	Antociandindinas
OH	OH	Cianidina
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina



R1	R2	R3	Flavonol
H	OH	H	Kaempferol
OH	OH	H	Quercetina
OH	OH	OH	Mricetina



Manzanas
Uvas rojas

Fuente: Gutiérrez (2019).

La identificación de flavonoides, se puede realizar por la prueba de Shinoda, donde se considera como positiva si se da coloración del rojo oscuro; puede variar hacia el rosado claro, si la presencia de flavonoides no es tan alta. Según Soto (2015, p. 16), se permite reconocer la presencia de los metabolitos cuando el ensayo se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos. Los flavonoides con el núcleo benzopirona

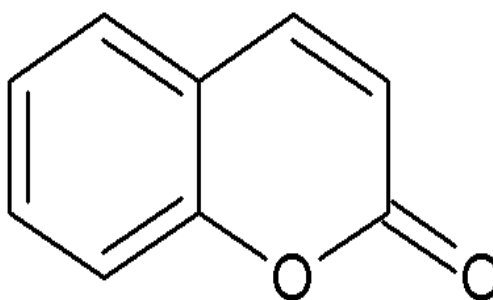
producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. (Colina, 2016, p. 6).

Cumarinas

Son una clase de lactonas, de origen natural o sintético; están formadas por un anillo de benceno condensado a un anillo α -pirona. Las cumarinas por lo general son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos; se producen de manera natural en plantas y microorganismos. (Pinto, 2013, p. 32).

Las cumarinas presentan interés a nivel farmacológico por sus propiedades anticoagulantes, antioxidantes, antivirales, inhibidores enzimáticos y antibacterianos. Además, por su característica única de contener oxígeno en el anillo de lactona, hace de estas moléculas un tipo de ligandos ideal para el ensamblaje supramolecular, por lo que naturalmente pueden ser utilizadas en el diseño racional y la síntesis de supramoléculas como agentes medicinales, principalmente en el campo antibacteriano y antifúngico, en que ha demostrado una función importante a la que se le ha prestado atención en los últimos años. (Pinto, 2013, p. 30).

Figura N° 16 Estructura básica de las cumarinas



Fuente: Correia Pinto (2013).

La identificación de cumarinas, según Pino, Álvarez & Prado (2017, p. 9), mencionan que estas:

se caracterizan por sus compuestos derivados de la α -benzopirona, ya que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, exhibiendo una fuerte fluorescencia azulada o azul-verdosa en la cámara UV a 366nm. Este tipo de compuestos pueden ser revelados usando una solución de KOH.

Taninos

Fueron definidos por primera vez por Bate-Smith y Swain en 1962. Estos metabolitos secundarios se encuentran distribuidos en varios sectores del reino de las plantas. Entre las funciones que cumplen los taninos, en el reino vegetal, se tienen que ayudan con la regulación del crecimiento de las plantas, además de protegerlas de animales depredadores, generando que las especies vegetales sean no comestibles. (Avello, 2016, p. 5).

Son sustancias de origen vegetal con masa molecular relativamente elevada; se caracterizan por ser hidrosolubles o condensados. Dentro de su clasificación, se distinguen los siguientes grupos:

Taninos hidrolisables: poliésteres conformados por ácidos orgánicos y un polialcohol o un azúcar. Su nombre se debe a que al ser tratados con ácidos diluidos, estos son capaces de generar una separación hidrolítica. Su azúcar principal es la glucosa; sin embargo, también se puede observar la presencia de xilosa, fructuosa y sacarosa. (Avello, 2016, p. 8).

Dependiendo del ácido por el cual estén conformados, se encuentran los galotaninos en presencia de ácido gálico y los elagitaninos, compuestos por ácido elágico, el cual se forma como mezcla de los ácidos gálico y hexahidroxidifénico. (Avello, 2016, p. 9).

Taninos condensados o proantocianidinas: son polímeros con una unidad estructural en el núcleo de flavan-3-ol, tales como catequina o epicatequina y epigallocatequina. Formados por la unión de dos a seis unidades, los cuales se unen en posición del carbono 4 y 8 (Avello, 2016, p. 10).

Entre sus funciones descritas para los taninos, también actúan como antioxidantes, ayudando a inhibir procesos como la peroxidación lipídica. A su vez, actúan como antiinflamatorios, antivirales, antimicrobianos, antitumorales, cardioprotectores, inhibidores de enzimas relacionadas con la diabetes, inmunomoduladores, antidiarreicos, además de sus propiedades vasoconstrictoras, empleadas en el tratamiento de alteraciones vasculares (Colina, 2016, p. 28).

Según Muñoz (2014, p. 10), define químicamente a los taninos como compuestos que se oxidan al contacto con el aire; son inoloros y de sabor agrio, solubles en agua, alcohol y acetona; en presencia del cloruro férrico y otras sales generan una reacción; son combustibles con un punto de inflamación de 199 °C, una temperatura de autoignición de 528.5 °C.

La presencia de taninos catéquicos se indica con una coloración verde en la prueba y una azul para los taninos gálicos. Al seguir las afirmaciones anteriores, el extracto E cambió la coloración de verde oscuro a verde un poco más claro.

Terpenos

Producidos a partir de los mismos precursores, constituyen el más grande conjunto de metabolitos secundarios de los vegetales. Estos compuestos tienen en común que se pueden considerar conformados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del isopreno. Están clasificados como lípidos insaponificables. (Coy, Parra % Cuca, 2014, p. 34).

Efecto positivo de la presencia de polifenoles de la mora en la salud

Desde hace varios años se ha indicado y especulado que algunos compuestos fenólicos, como los flavonoides, ayudan a disminuir el número de enfermedades no transmisibles, indicadas como la fuente de alto porcentaje en muertes a nivel mundial; las principales son las enfermedades cardiovasculares, respiratorias crónicas y diabetes. (Haminiuk et al., 2012, p. 18).

Quirós (2016, p. 11) menciona que “la presencia de polifenoles encontrados en la mora, principalmente las antocianinas, generan un efecto antioxidante, antiinflamatorio, hipoglicemiante, antibacteriano además disminuyen los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y logran inducir la saciedad”. La semilla de la mora presenta altos contenidos de los aceites oleico, linoleico, linolénico y palmítico esencial, para la prevención de enfermedades del corazón y cáncer. (Retana & Cerdas, 2005, p. 13).

También evita la inflamación celular, asociada a la artritis. El consumo de mora es importante, ya que posee un alto contenido de antocianinos y carotenoides, que son antioxidantes, los cuales neutralizan la acción de los radicales libres, produciendo efectos antiinflamatorios y de acción antibacteriana. Además, en situaciones como embarazo, lactancia, tabaquismo, problemas de circulación, estrés, cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas recomiendan el uso de mora y otras bayas silvestres, que tienen un alto contenido de vitamina C, posee además un efecto diurético. (Retana & Cerdas, 2005, pp.13-14).

El extracto de mora y diferentes bayas llaman la atención de los productores y consumidores, principalmente por los beneficios que estos frutos ofrecen a la salud del ser humano, gracias a su alto contenido de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante.

El principal tipo de compuestos fenólicos que se encuentran en las especies *Rubus* son los taninos o fenoles, dentro de los cuales se destacan los elagitaninos y luego las antocianinas. Seguidamente se encuentran los flavonoles, el ácido elágico y el ácido gálico. En *Rubus* spp el contenido de elagitaninos y antocianinas tiene una relación inversa con respecto al grado de maduración de la mora, ya que el contenido de elagitaninos se reduce con la maduración, mientras que las antocianinas se incrementan. Los procedimientos térmicos y periodos largos de almacenamiento afectan el contenido

fenólico de los jugos de bayas, causando la disminución de algunos compuestos y el aumento de otros. (Sánchez, 2014, p. 10).

Extracto

Zapata (2002, p. 9) define un 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. Para poder determinar las propiedades terapéuticas de una droga vegetal se necesita de técnicas elaboradas, que permitan tener métodos reproducibles, para que haya una cuantificación de los principios activos; por ejemplo: técnicas como maceración, destilación por rotavapor y método de extracción. Se describirán, a continuación, algunas de ellas. (Peña, 2019, p. 63).

Maceración

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el disolvente, formando un conjunto homogéneo, en el cual el diluyente actúa sobre las proporciones de la droga, circulando en todas las direcciones, disolviendo cada principio activo hasta producir una concentración en equilibrio. (Carrión & García, 2010, p. 18).

Es recomendado protegerlo de la luz, para evitar posibles reacciones, y debe agitarse continuamente; el tiempo de maceración es diverso; las distintas farmacopeas prescriben tiempos que varían entre cuatro y diez días. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento”. (Carrión & García, 2010, p19).

Destilación a presión reducida (Rotavapor)

Peña (2019, p. 78) define la destilación a presión reducida como:

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 rotavapor 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.

Figura N° 17 Equipo de destilación por rotavapor



Fuente: Elaboración propia.

Extracción líquido-líquido mediante embudo separador

El material debe prepararse por un proceso de molido, macerado o picado, para

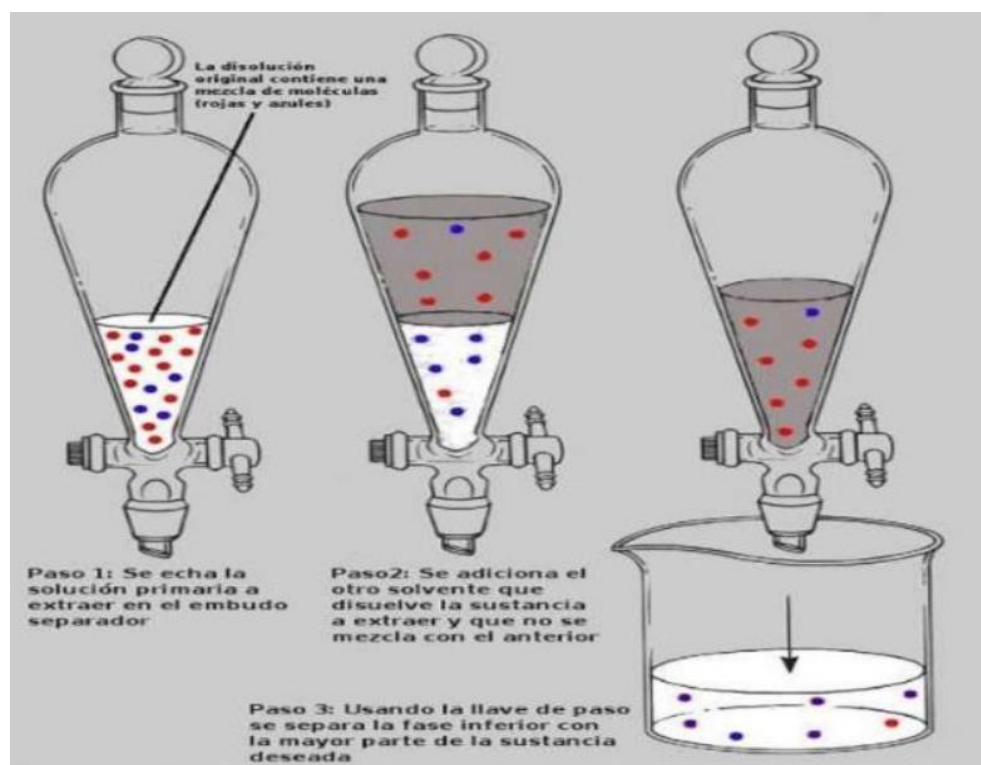
facilitar el contacto entre el sólido y el solvente. El objetivo es permitir un mayor contacto entre el sólido y el líquido, donde ambos estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. (Paredes & Quinotoa, 2010, p. 54).

Los disolventes más empleados son etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona y cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los disolventes se recuperan por destilación, y pueden ser reutilizados. El disolvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, carbohidratos. (Paredes & Quinotoa, 2010).

Se sabe que, a temperaturas elevadas, la velocidad de evaporación acelera; sin embargo, los compuestos polifenólicos presentes pueden verse afectados y perder su estabilidad, como por ejemplo la degradación de las antocianinas a altas temperaturas, por lo que se procura mantener una temperatura por debajo de los 50 °C en un alto tiempo de extracción, para aumentar el rendimiento y asegurarse de la estabilidad de los metabolitos. (Quiros, 2016, p. 16).

En la etapa de recuperación de los disolventes, ya sea atmosférica o al vacío, después de los condensadores, se dispone de una unidad de enfriamiento, para la menor pérdida del solvente. El material residual en la recolección de destilación contiene concentradas las materias odoríficas. En caso de emplear glicoles, aceites vegetales o aceites minerales como solventes extractores, se pierden ciertos componentes imposibles de recuperar, generando un producto conocido como “extractos”. (Paredes & Quinotoa, 2010, p. 54).

Figura N° 18. Extracción con solventes



Fuente: Imágenes Google (2018).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

El efecto antimicrobiano se define como el poder específico y la capacidad del producto para lograr alguna propiedad beneficiosa; por ejemplo: su capacidad frente a un organismo determinado, el cual se puede denominar halo de inhibición; esto se logra determinado un análisis microbiológico. La capacidad de un antibiótico se logra demostrar por medio del efecto inhibitorio de la sustancia frente a un microorganismo, por medio de una observación cuantitativa. (Arias & Leitón, 2019, p. 101).

La concentración mínima inhibitoria (CMI), determina, en un período de tiempo, la capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento *in vitro* bacteriano; se basa en la interpretación que se le debe dar al halo de inhibición, medible en 3 niveles: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). (Arias & Leitón, 2019, p. 102).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Según Picazo & García (2015, p. 108), hablan sobre la sensibilidad antimicrobiana:

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a un antimicrobiano, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Asimismo, ofrece, en su conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son técnicas de gran importancia en la investigación; los resultados se pueden ver modificados, por distintos factores involucrados. Desde la recolección de los frutos y plantas, el método de extracción, la elección del medio y técnica utilizada para la determinación de actividad antimicrobiana, pueden intervenir en los resultados finales. (Arias & Leitón, 2019, p. 109).

Arias & Leitón (2019), mencionan que:

la metodología recomendada para este tipo de pruebas es el método de difusión, ya que es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización, y está indicado para microorganismos no exigentes y de crecimiento rápido. Este método está apoyado por datos clínicos y de

laboratorio y, además, presenta la ventaja de ser reproducible en el método de Kirby-Bauer.

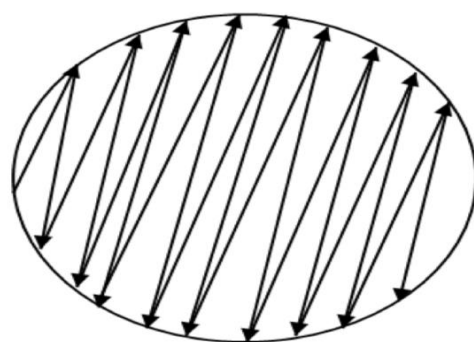
Método Kirby-Bauer

El inicio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. Los doctores Bauer, Kirby, Sherris & Turck, en 1966, publicaron su estudio describiendo la prueba, probaron todas las variables involucradas en el proceso, como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. Esta técnica sigue siendo utilizada en la actualidad. (Cavalieri, 2005).

Es el más utilizado en bacteriología clínica, permitiendo obtener resultados con buena exactitud. Al ser un método estandarizado, sencillo, rápido y económico, permite ser utilizado de modo cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo; este último es el más utilizado. (Talavera, 2014).

En este método, el medio de cultivo se siembra con la cepa microbiana mediante un vertido en placas sobre el medio de cultivo; se colocan cantidades definidas del antimicrobiano a ensayar y del estándar como patrón de comparación, en puntos distanciados entre sí. Para la aplicación de estos antibióticos se utilizan pequeños cilindros, pocillos o discos con el antibiótico incorporado. (Cavalieri, 2005, p. 41).

Figura N° 19. Siembra con la cepa microbiana mediante un vertido en placas sobre el medio de cultivo

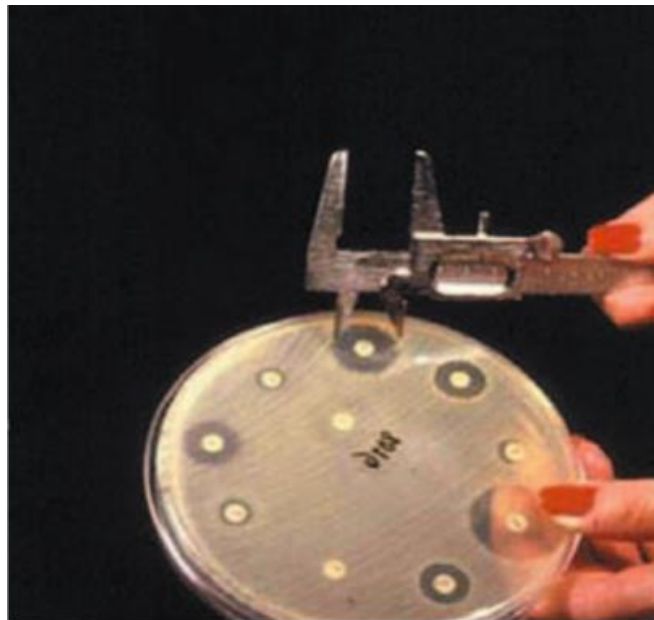


B
ASM MicrobeLibrary © Hudzicki

Durante la incubación en temperaturas adecuadas, se producen alrededor de los pocillos de aplicación unos halos de inhibición, impidiendo el crecimiento microbiano; el diámetro define una medida relativa de la actividad del antimicrobiano en cuestión; comparando el diámetro de los halos de inhibición del patrón de antibióticos con el antibiótico sometido a ensayo, puede calcularse la actividad de este último. (Talavera, 2014).

Talavera (2014) menciona que, cualitativamente, se puede describir si el halo es sensible, resistente o intermedio. El poco desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es "S, sensible" al antimicrobiano, lo que lleva a pensar que el antimicrobiano puede utilizarse en dosis terapéuticas. El crecimiento del microorganismo alrededor del disco indica que es "R, resistente" al antimicrobiano, por lo cual no debe emplearse. Existe un tercer tipo "I, intermedia", cuando los diámetros de los halos son menores a "S" y mayores a "R", que es la que exigen las dosis de antimicrobianos superiores a las habituales para obtener respuesta terapéutica favorable, siempre y cuando no produzca efectos secundarios.

Figura N° 20. Halos de inhibición en un medio de cultivo por técnica de difusión



Fuente: Cavalieri (2005).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

Enfoque de la investigación

El enfoque de esta investigación será cuantitativo, según Hernández, Fernández & Baptista (2014); este es secuencial y probatorio; cada etapa precede a la siguiente, y no se puede “brincar” o eludir pasos; se intenta probar una hipótesis con base en el análisis de resultados obtenidos (con frecuencia utilizando métodos estadísticos), y se establece una serie de conclusiones respecto de la(s) hipótesis planteada(s). (p. 4).

La razón de esto es porque se pretende hacer un fraccionamiento de *Rubus spp* con diferentes disolventes de distintas polaridades, para obtener diferentes extractos. Se realiza un tamizaje fitoquímico para conocer los metabolitos secundarios presentes, y probar su actividad antimicrobiana contra la bacteria *streptococcus mutans*.

Diseño de la investigación

De acuerdo con Hernández (2014, p. 10), un estudio cuantitativo es utilizado para consolidar una creencia que es formulada de manera lógica en una teoría o un esquema teórico, siendo establecida por una exactitud de patrones de comportamiento en una población determinada. También se menciona que la investigación cuantitativa ofrece la posibilidad de generalizar resultados de forma amplia, otorgando control sobre fenómenos, así como un punto de vista basado en controles y magnitudes. (Hernández, 2014, p. 15).

También se menciona que este estudio es secuencial, y cada etapa antecede a la siguiente; se intenta probar una hipótesis con base en el análisis de resultados obtenidos, donde se establece una serie de conclusiones respecto a la hipótesis planteada desde un inicio. (p. 4).

Con esto se pretende incubar la bacteria *Streptococcus mutans* en cajas de Petri, en un medio favorecedor, donde la variable de la respuesta corresponderá al tamaño de los halos de inhibición producidos con las diferentes concentraciones de *Rubus spp* a

concentraciones diferentes, con controles positivos de clorhexidina y negativos con suero fisiológico.

La investigación cuenta con dos tipos de diseño; el primer diseño será explicativo, responde la causa de los fenómenos y eventos de interés, y explica por qué ocurre un fenómeno. (Hernández et al., 2014, pp. 95-96).

Para finalizar con los resultados obtenidos en la presente investigación, se determina si el extracto de *Rubus spp* presenta efecto antibacteriano frente a la bacteria patógena *S. mutans*, por medio de las pruebas fitoquímicas, determinando los metabolitos secundarios presentes y el diámetro en milímetros del halo de inhibición.

El otro diseño es el exploratorio, donde Hernández et al. (2014, p. 91) mencionan que el objetivo es estudiar un tema de investigación poco o no conocido, o bien donde se tienen ciertas incertidumbres, debido a que en Costa Rica no hay estudios sobre la actividad *Rubus spp* frente a la bacteria productora de la carie, y este trabajo puede alentar a futuras investigaciones que deseen formular alguna forma farmacéutica de origen natural.

Variables

En este trabajo de investigación el cuadro de operacionalización de variables va en función de los objetivos específicos planteados.

Cuadro N° 7. Operacionalización de variables

Objetivo Específico	Variable	Definición contextual	Indicador	Instrumento
------------------------	----------	--------------------------	-----------	-------------

Determinar la actividad antibacteriana, del extracto rico en flavonoides de <i>Rubus spp</i> (mora).	Actividad antibacteriana.	Poder de inhibición del crecimiento. o bien la eliminación de los microorganismos. Rivera (2003).	Concentración del extracto de <i>rubus spp</i> en distintos porcentajes.	Rotavapor. Embudo separador. Pruebas cualitativas. Prueba de Dragendorff, Prueba de Shinoda, Prueba de KOH, Prueba de Liberman, Burchard, Prueba de Borntrager-Kraus, Prueba de Benedict, Prueba de Taninos, Prueba Lugol, Prueba de Espuma.
Comprobar la eficacia <i>in vitro</i> de los halos de inhibición producidos por los extractos de <i>Rubus spp</i> en diferentes concentraciones sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	Sensibilidad de la bacteria.	Determinar la sensibilidad o resistencia de la bacteria a un grupo de antibióticos. (Águila, 2016).	Diámetro del halo de inhibición.	Placa de Petri con el medio de cultivo Bacteria <i>S. mutans</i> . Incubadoras. Regla.
Relacionar la sensibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> a los extractos acuosos de <i>Rubus spp</i> , el	Sensibilidad del <i>Streptococcus mutans</i> .	Determinar la sensibilidad o resistencia de la bacteria a un grupo de antibióticos.	Diámetro del halo de inhibición.	Clorhexidina. Suero fisiológico.

control positivo clorhexidina y el control negativo con agua destilada.		(Águila, 2016).		
---	--	-----------------	--	--

Fuente: Elaboración propia.

Instrumentos y Técnicas

A continuación, se describen instrumentos, técnicas, métodos a utilizar en la siguiente investigación, en la Universidad Internacional de la Américas y en el Laboratorio de Microbiología Microlabs, ubicado en Guadalupe, San José, Costa Rica.

Materiales y Equipos usados para los extractos de *Rubus spp*

Recolección de moras.

Embudo separador.

Aro metálico.

Goteros.

Vidrio 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 ± 0.01 g.

Botella ámbar.

Filtro al vacío.

Rotavapor Yamato, modelo BM500.

Viales.

Buchner.

Kitasato.

Probeta.

Bomba Zeny, modelo VP 125.

Tamizaje fitoquímico a los extractos de la mora

A los extractos obtenidos se les sujeta a distintas pruebas, para determinar los metabolitos secundarios:

Prueba de Dragendorff.

Prueba de Shinoda.

Prueba de KOH (cumarinas).

Prueba de Liberman Burchard.

Prueba de Borntrager-Kraus.

Prueba de Benedict.

Prueba de Taninos.

Prueba de Vainillina.

Prueba de Yodo Metal.

Prueba de Luz ultravioleta.

Prueba Lugol.

Prueba de Espuma.

Pruebas de Sensibilidad de los extractos de mora frente a la bacteria *S. mutans*

Equipos y materiales para las pruebas microbiológicas

Jeringas 5ml.

Filtro de jeringa 0.22 μm estéril.

1 tubo de ensayo.

Asa bacteriológica.

Mecheros.

Cepa de *Streptococcus mutans*.

Torunda estéril.

Goteros.

10 placas de Petri con agar tripticasa de soya estándar

Estándar McFarland.

Regla con escala métrica.

Cámara de flujo laminar.

Incubadora Thermo Scientific.

Reactivos a utilizar

Solución salina al 0.9%.

Suero fisiológico.

Clorhexidina 0.12%.

Extracto de diclorometano.

Extracto de acetato de etilo.

Extractos acuosos de *Rubus spp.*

Blanco de dimetil sulfóxido al 10%.

Agua destilada.

Procedimiento

La recolección de moras se efectuó en mayo del 2019. El extracto se obtuvo a partir de frutos maduros de *Rubus spp*, recolectados en la comunidad de El Jardín de Páramo, en Pérez Zeledón, San José, Costa Rica. Se recolectaron 1000 gramos de fruta.

Figura N° 21. Mora recolectada para la realización de la investigación



Fuente: Elaboración propia.

Se tomó la muestra para lavarla y secarla con un papel toalla al aire libre. Una vez limpias y secas las moras, se procedió a picar finamente con cuchillo y una tabla de picar; del tamaño de la partícula dependerá el rendimiento de la extracción; la transferencia de masa de la extracción se mejora si se utiliza un tamaño de partícula pequeño, facilitando la penetración del disolvente. (Quirós, 2016, p. 16). Posteriormente se pesó el contenido en un beaker de 1000 ml, en una balanza marca Ballar de 2000.00 ± 0.01 g, donde se obtuvo un total de 968 gramos de frutas trituradas, de los cuales se utilizaron 678 gramos para la maceración.

Figura N° 22. Gramos totales de mora pesada en balanza Ballar de $2000.00 \pm 0.01\text{g}$



Fuente: Elaboración propia.

Extracciones metabólicas por técnica de maceración de la fruta *Rubus spp*

En una botella grande de color ámbar con cierre hermético, se colocan los 678 gramos de mora triturada, donde se le agregó el disolvente, en este caso etanol al 70%, donde se midió 730 mL de etanol al 96%, con 271 mL de agua destilada.

El frasco se cerró y se tapó la parte superior del cierre con papel parafina, para luego cubrirlo con papel periódico en un armario oscuro, seco y fresco, por un tiempo de 15 días, agitando ocasionalmente mínimo una vez al día una vez hasta que finalizara el tiempo de maceración. Concluidos los 15 días, 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 limpio y seco.

Figura N° 23. Recipiente con el material en maceración y equipo para filtración al vacío del material macerado de la mora



Fuente: Elaboración propia.

Concentración del extracto por destilación con presión reducida

Lo recolectado en el proceso de filtración procedió a la destilación por rotavapor marca Yamato modelo BM500, donde el filtrado se colocó en un matraz de destilación de 500 mL; se calibraron la temperatura a 50 °C y la velocidad del equipo de rotación, para concentrar el extracto, eliminando el etanol. El proceso concluyó hasta que no se destilara más cantidad de etanol.

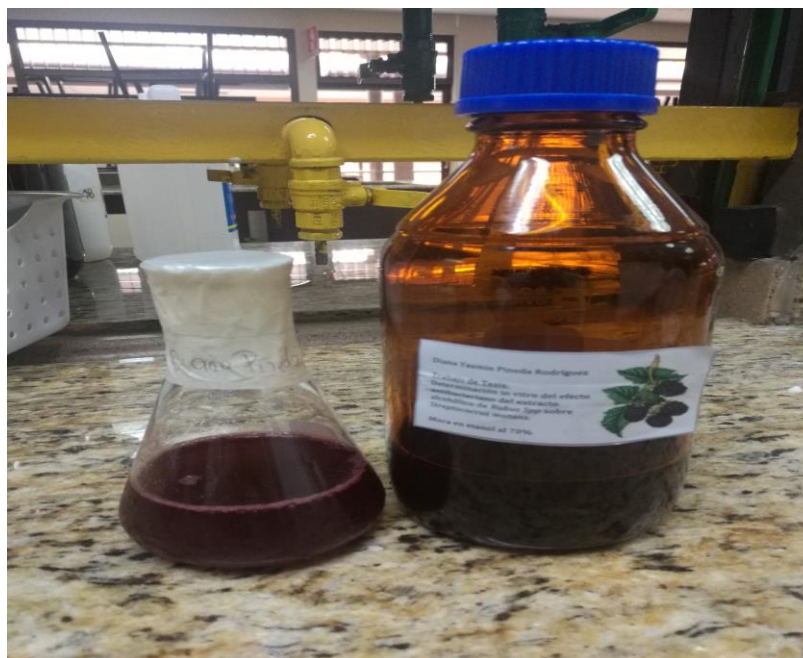
Figura N° 24. Método de destilación del extracto en el rotavapor



Fuente: Elaboración propia.

Del matraz de destilación se recolectaron 390mL de extracto acuoso libre de etanol. El extracto se separó en dos partes iguales, donde la primera parte fue utilizada para las pruebas microbiológicas, la cual fue sometida a un fraccionamiento de extracciones con diclorometano y acetato de etilo, ambos de marca LABQUIMAR, y el resto se destinó para elaborar el tamizaje fitoquímico y, de esta manera, poder caracterizar el material vegetal con el que se estaba trabajando.

Figura N° 25. Extracto acuoso concentrado de *Rubus spp*



Fuente: Elaboración propia.

Caracterización fitoquímica del extracto *Rubus spp*

Se realizó el tamizaje fitoquímico completo a partir del extracto obtenido en el proceso de concentración del macerado con etanol al 70%. Se siguió el procedimiento del Manual de Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Internacional de las Américas, elaborado por el Licenciado Javier Rodrigo Alpízar Cordero, quien toma como referencia a Domínguez (1973).

Extracción

- 1- Se tomaron 190 mL del extracto concentrado y se colocaron en un embudo separador; se agregaron 25mL de éter etílico; se mezcló levemente, sin generar emulsión y liberando el gas de forma continua

por la llave del embudo, hasta equilibrar las presiones y ya no saliera más gas.

- 2- Se colocó el embudo separador en el soporte y se retiró la tapa del embudo.
- 3- Se dejó reposar hasta observar la división de dos fases. Se observa la fase más densa (acuosa), en el fondo del embudo y la fase menos densa en la superficie (éter etílico).
- 4- La fase acuosa se retiró primero por la boquilla de abajo; posteriormente se retiró por la boca superior el extracto etéreo.
- 5- El extracto etéreo se rotuló como (E) y el extracto acuoso se separó en dos partes, que se rotularon como (AQ2A y AQ1).
- 6- Se repitieron los pasos 2, 3 y 4. El proceso se realizó tres veces.
- 7- Ambos extractos se guardaron; el acuoso en refrigeración, para evitar el crecimiento de microorganismos y el etéreo a temperatura ambiente.

Figura N° 26. Extracción líquido-líquido en embudo separador del extracto acuoso con éter etílico



Fuente: Elaboración propia.

Extracto etéreo

- 1- Se concentró el extracto a un volumen no mayor de 30mL en baño maría a 40 °C.
- 2- Se dejó enfriar, y posteriormente se realizaron las diferentes pruebas de identificación.

Pruebas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el fruto de la mora

Prueba de identificación de alcaloides (Dragendorff)

- 1- Se tomaron 4mL del extracto etéreo, y se colocaron en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó completamente en baño maría.
- 3- Se disolvió el residuo en 3mL de HCl al 2%.
- 4- Se agregaron 3 gotas con gotero, las gotas necesitan ser deslizadas por las paredes del tubo de ensayo, del reactivo de Dragendorff.
- 5- Se observó si hubo cambio de coloración y formación de precipitado.

Prueba de identificación de flavonoides (Shinoda)

- 1- Se tomaron 4mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó por completo en baño maría.
- 3- Se agregaron 2mL de metanol para disolver el residuo.
- 4- Se calentó la muestra en baño María y se adicionó una punta de espátula de limaduras de magnesio.
- 5- En la capilla se le agregó 1mL de HCl concentrado y se dejó reposar en un beaker; se generó un burbujeo violento.
- 6- En la muestra se observó si hubo cambio de coloración.

Prueba de identificación de cumarinas (KOH)

- 1- Se tomaron 4mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó en baño María.
- 3- Seguidamente, se disolvió el residuo en 1mL de agua hirviendo.
- 4- Con un capilar, se aplicaron, de forma separada, dos gotas en un papel de filtro
- 5- Se utilizó lámpara UV, a una longitud de onda de 366 nm.

- 6- Se colocó el papel de filtro debajo de la lámpara, apuntando a una de las muestras anteriormente aplicadas.
- 7- Sobre la muestra se aplicó una gota de KOH 0,5 mol/L.
- 8- Se observó, para determinar si hubo cambio de coloración.

Prueba de identificación de triterpenos y esteroides (Lieberman/Burchard)

- 1- Se colocaron 4mL del extracto etéreo en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó el disolvente en baño María.
- 3- Se disolvió el residuo en 1mL de CHCl_3 (cloroformo) en la capilla.
- 4- Se adicionó, al tubo de ensayo, 1mL de anhídrido acético, y se agitó bien.
- 5- Posteriormente, se inclinó el tubo y se agregaron lentamente 3 gotas de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo, pero sin agitar la muestra.
- 6- En la muestra se observó si hubo cambio de coloración.

Prueba de identificación de antraquinonas (Bornträger-Kraus)

- 1- Se tomaron 4mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó el disolvente en un baño María.
- 3- Se disolvió el residuo en 1mL de NH_4OH al 25%.
- 4- Se observó, para determinar si hubo cambio de coloración.

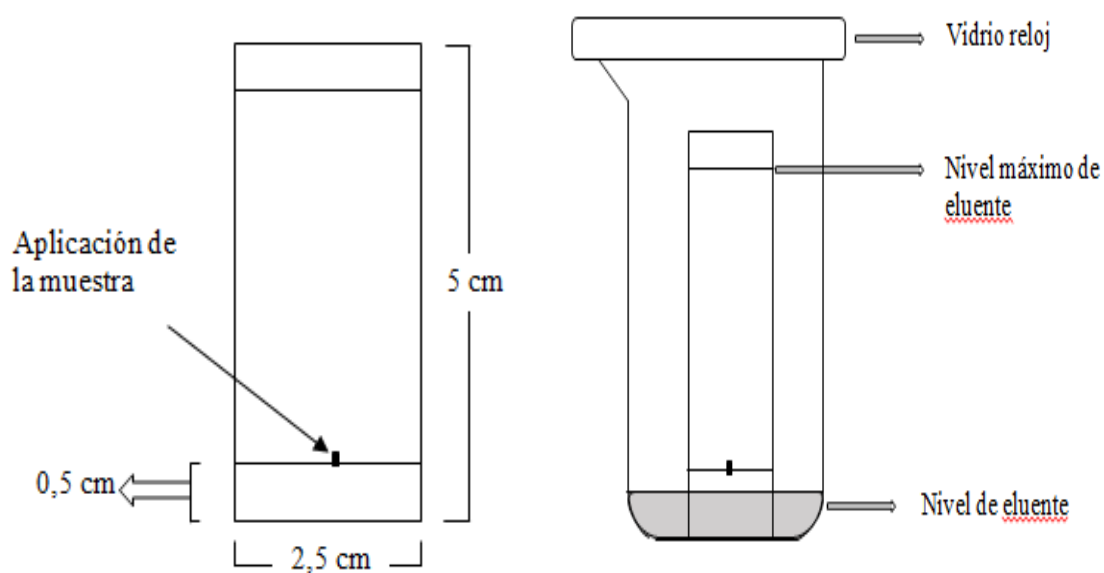
Prueba de identificación de taninos

- 1- Se tomaron 4mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó el disolvente en baño María; se observó un residuo.
- 3- Se disolvió el residuo en agua caliente y con cinco gotas de FeCl_3 al 1%.
- 4- La muestra se observó, para determinar si hubo cambio de coloración.

Cromatografía de capa fina TLC para la determinación de terpenos

- 1- Se prepararon 3 placas cromatográficas con fase estacionara de sílica gel con fluorescencia a 254nm (TLC sílica gel F₂₅₄), Con una medida de 5 x 2,5 cm. Se trazó una línea con lápiz en la parte superior e inferior, desde los bordes a 0.5 cm, y se colocó un punto en el centro de la parte inferior, donde se realizó la aplicación de la muestra. (Véase la figura 27).
- 2- Se realizó la elaboración de la fase móvil para correr la placa, en la cual se colocó una proporción 9:1 de hexano y de acetato de etilo.
- 3- Con un capilar se tomó la muestra del extracto etéreo, y se aplicó una pequeña cantidad en las placas cromatográficas preparadas con anterioridad; luego se dejó evaporar el disolvente.
- 4- Se armó el sistema cromatográfico, como se muestra en la figura 27. Se tuvo el cuidado de que la cantidad de eluyente que se agregó en el sistema no estuviera por encima del punto de aplicación de la muestra.
- 5- Se retiraron las placas cuando el eluyente llegó a la marca de 0.5 cm de la parte superior.
- 6- Se dejó secar bien, y la primera placa se observó con la luz UV a 254 y 365nm.
- 7- La segunda placa se reveló con el reactivo vainillina- ácido sulfúrico en etanol; se agitó bien, y con un gotero se colocaron varias gotas del reactivo, hasta que la placa quedó bien impregnada. Se realizó desde la parte superior de la placa y se dejó correr en línea recta. Se dejó secar.
- 8- Esta placa se quemó en el calentador-agitador, con la parte metálica en contacto con el calentador, y se retiró cuando la coloración se observó intensa.
- 9- La tercera placa se reveló, utilizando yodo metálico; se observó el resultado y se tomó nota.

Figura N° 27. Dimensiones de la placa y sistema cromatográfico para identificación de terpenos



Fuente: Alpízar (2019).

Extracto acuoso (AQ1)

Se sacó la muestra acuosa del refrigerador y se dividió en dos recipientes pequeños, en volúmenes iguales rotulados como AQ1 y AQ2. Se guardó AQ2 en el refrigerador.

Prueba para determinación de almidón (Lugol)

1- Se tomaron 2mL de AQ₁ y se colocaron en un tubo de ensayo.

- 2- Se agregó gota a gota el Lugol, esperando que la muestra se mostrara azul; si no hay cambio de color se añade más hasta un máximo de 2mL del reactivo.
- 3- Se observó el cambio o la ausencia de cambio en la coloración.

Prueba para determinación de saponinas (Espuma)

- 1- Se agregaron 3mL de AQ₁ a un tubo de ensayo, se tapó con papel parafina, se agitó por un minuto y se dejó reposar en la gradilla por un tiempo de 20 min.
- 2- Se observó si hubo presencia de espuma en la muestra.

Prueba para determinación de azúcares reductores (Benedict)

- 1- Se tomaron 3mL de la muestra y se colocaron en un tubo de ensayo.
- 2- Se agregaron 10 gotas del reactivo rotulado como Benedict; se agitó.
- 3- Se calentó la muestra en baño María, y se esperó de 5 a 10 min.
- 4- Se observó si hubo presencia de un precipitado.

Con la muestra del extracto AQ₁, para las pruebas de taninos y Prueba de Dragendorff se siguió el procedimiento que fue descrito anteriormente.

Extracto acuoso AQ2

- 1- Se sacó del refrigerador la muestra AQ2.
- 2- Se agregó un volumen de 10mL de HCl 3M; se agitó bien y se calentó en baño maría por 20 min.
- 3- Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- 4- La muestra se colocó fría en un embudo separador, y se procedió a realizar de 3 a 5 extracciones con éter etílico. Para esto se siguió el mismo procedimiento, denominado Extracción.

5- Se separó el extracto etéreo como AQ₂E y el acuoso como AQ₂A.

Muestra AQ₂E

Se concentró la muestra y se realizaron las pruebas que se indican a continuación, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente:

Prueba de Dragendorff.

Prueba de Shinoda.

Prueba de KOH.

Prueba Liberman Burchard.

Prueba de Borntrager-Kraus.

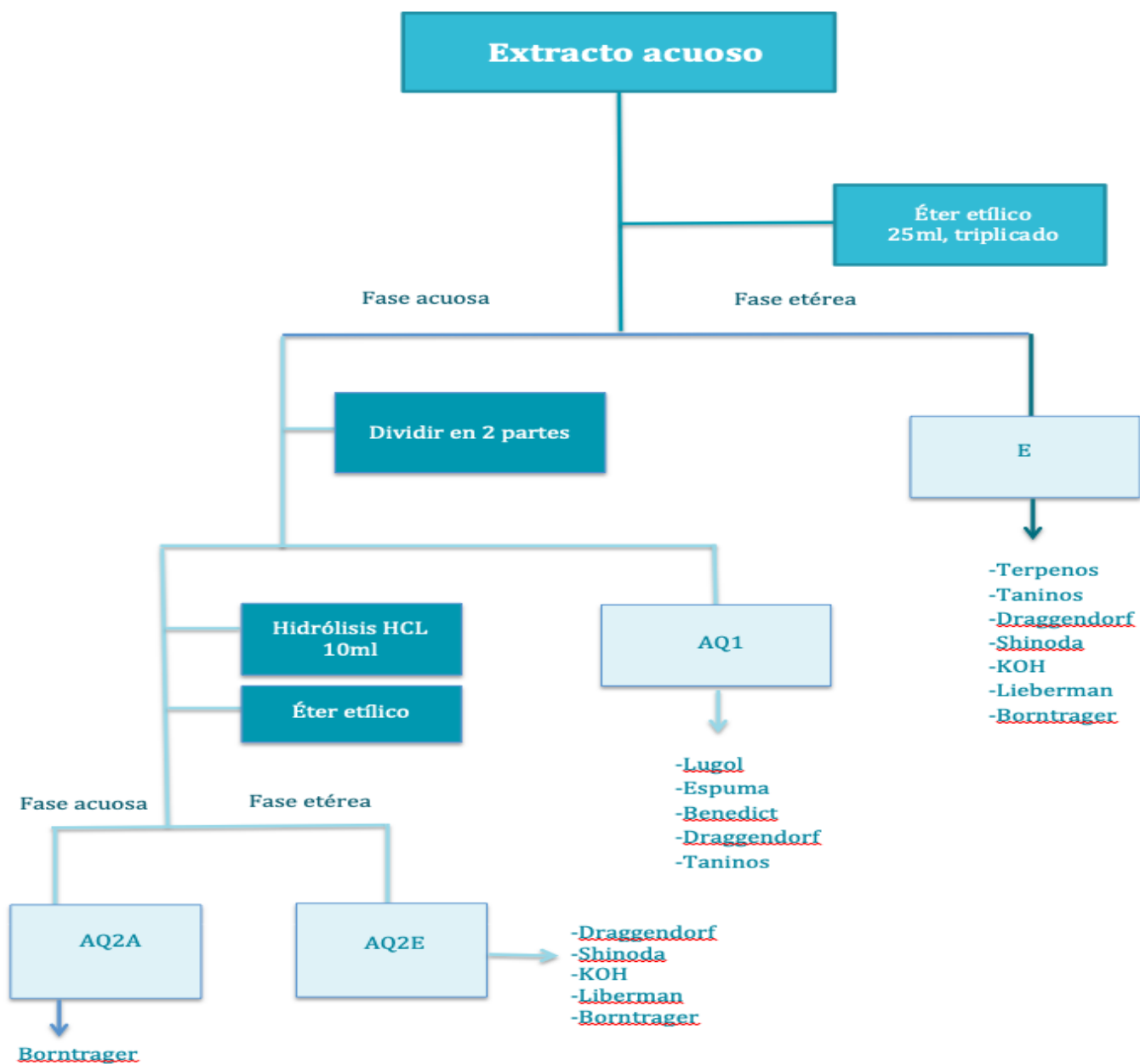
Muestra AQ₂A

Prueba de Borntrager-Kraus

- 1- Se tomó 1 mL de muestra y se llevó a un pH de 9, agregando lentamente y con agitación constante gotas de una disolución de NaOH. El pH se verificó con tiras reactivas.
- 2- Se observó la coloración.

A continuación, se observa un esquema del sistema empleado en la diferenciación de metabolitos secundarios de los diferentes extractos, basado en el Manual de Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Internacional de la Américas, elaborado por el Licenciado Javier Rodrigo Alpízar Cordero.

Figura N° 28. Diagrama del proceso de separación para la elaboración del tamizaje fitoquímico y las pruebas que se aplicaron



Fuente: Elaboración propia.

Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de *Rubus spp*

Se evaluó la posible actividad antibacteriana de los diferentes extractos obtenidos a partir del fruto de mora (acuoso, con diclorometano y acetato de etilo) frente a cepas de *Streptococcus mutans*. La cepa se obtuvo del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, facilitada por el Dr. Carlos Chacón Díaz.

Los análisis microbiológicos se desarrollaron en Laboratorios de Microbiología Microlabs, ubicado en Guadalupe, San José, Costa Rica, bajo la supervisión y guía del Dr. Ronald Ajún (microbiólogo), y en la Universidad Internacional de la Américas, bajo el control de Lic. Carlos Castro Mejía. Todos los materiales, insumos y equipo fueron suministrados por el laboratorio microbiológico Prelab, clínica Visan y la Universidad Internacional de las Américas. El medio de cultivo utilizado en las placas de Petri fue tripticasa de soya.

Se utilizaron primeramente todos los extractos al 100%; como control positivo para las muestras se utilizó clorhexidina al 0.12%, este es un coadyuvante al control mecánico del biofilm oral, utilizado por pacientes con riesgo de generar caries y tratamiento para la gingivitis. Se aplicaron, como blanco, los solventes utilizados para las extracciones, con el objetivo de comprobar si pudieron intervenir o no en el ensayo y un control negativo de suero fisiológico.

Concentración y dilución de los extractos de *Rubus spp*

Se realizó una extracción con embudo separador de disolventes, con dicloro metano y acetato de etilo con 20 mL, respectivamente, por triplicado. Posteriormente, se evaporó para obtener el extracto libre del disolvente; se observó la presencia de un residuo, el cual

se colocó en un vial y se disolvió con dimetil sulfóxido al 10%, para obtener una concentración del 100%; de esta se tomaron con micropipetas para lograr concentraciones al 50% y al 25%.

Figura N° 29. Determinación de la masa de extracto acuoso contenido en un vial de vidrio



Fuente: Elaboración propia.

Cultivo de cepas Bacterianas en Laboratorio de Microbiología de la UIA

1. En este proceso, primero se prepararon los materiales a utilizar en una autoclave marca Series 2100, donde se colocaron 20 discos de papel de filtro, 8 tubos de ensayo pequeños, una solución salina de 0,9 en una botella pirex color ambar, 6 torundas, 4 pinzas en bolsas estériles, por un tiempo aproximado de 40 minutos, con una temperatura de 121 °C.

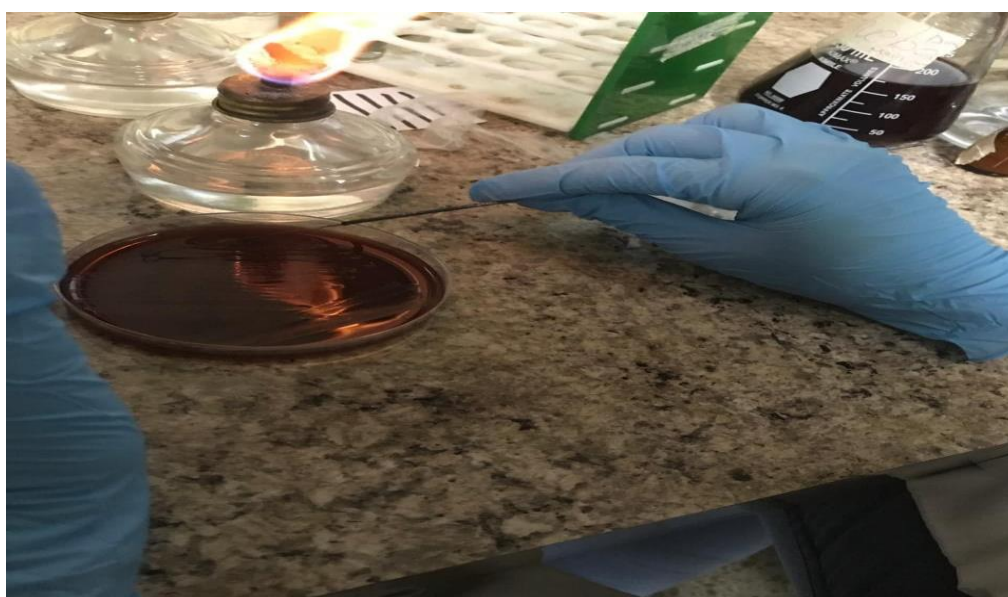
2. Se procedió a secar las bolsas retiradas de la autoclave, por un tiempo de 8 horas a temperatura ambiente.
3. En el Laboratorio de Microbiología de la UIA, se colocó un número de 6 mecheros en círculo, formando un campo estéril en la mesa de trabajo.
4. Dentro del campo estéril se tomó una colonia aislada de la cepa con un asa microbiológica previamente calentada y esterilizada en un mechero; seguidamente se estandarizó la concentración de bacterias; para ello se introdujo el asa estéril en un tubo con 5mL de solución salina a 0.9% anteriormente autoclavada, y se comparó su turbidez contra la de un estándar en la escala de McFarland, colocando los tubos frente a un papel blanco o una tarjeta de archivo con líneas negras.
5. Se impregnaron los papeles filtro con la disolución respectiva al 100%, clorhexidina al 0.12% y control negativo de suero fisiológico; se procedió a realizar rayados de la cepa estandarizada de *S. mutans* con torundas estériles en la placa de Petri con agar tripticasa de soya; con un movimiento de lado a lado, logrando, así, cubrir toda la placa, y se colocaron en la placa, las cuales se taparon y se ubicaron en la incubadora Science Teaching Incubator de la UIA, a una temperatura de 37 °C.
6. Se determinó el halo de inhibición 48 horas después, con una regla en centímetros.

**Figura N° 30. Preparación de placas microbiológicas en Laboratorio de Microbiología
UIA**



Fuente: Elaboración Propia.

Figura N° 31. Toma de la bacteria con asa micológica estéril

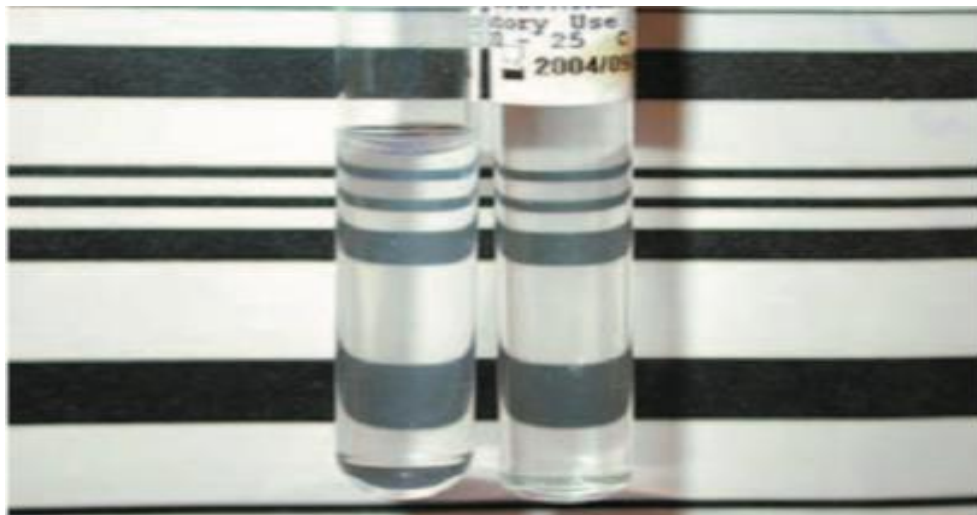


Fuente: Elaboración propia.

Cultivo de cepas Bacterianas en el laboratorio Microlabs

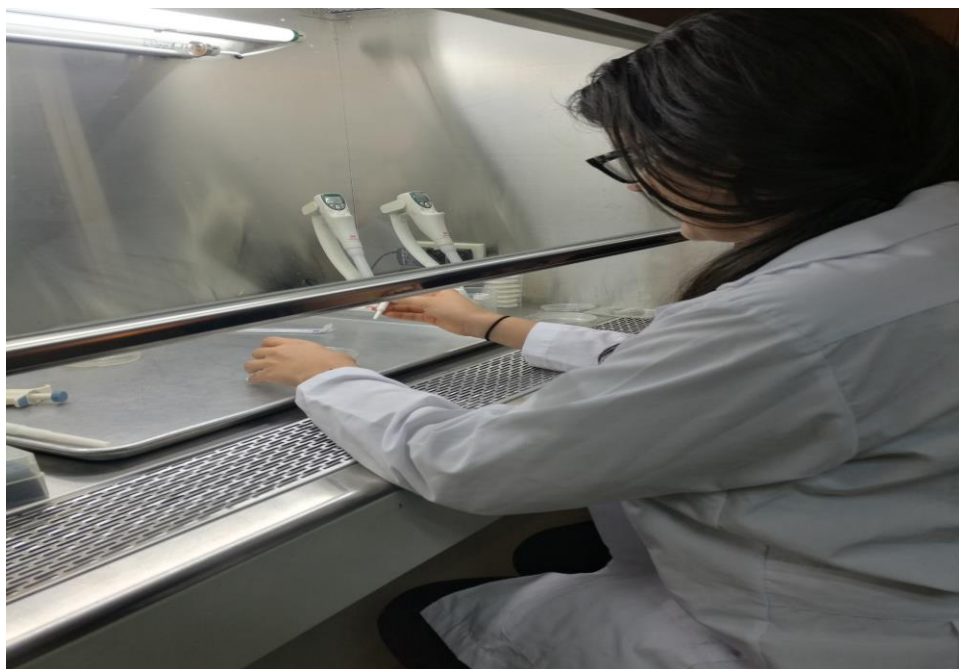
1. En este método formo pocillos de un tamaño igual a grosor del agar de 4 mm de espesor, cada uno con un diámetro de 0.5 cm y el cual recolectaba una cantidad aproximada a 40 μ L con una concentración del antimicrobiano, con las bases estériles de micropipetas y con ayuda de un asa microbiológica estéril.
2. Se tomó una colonia aislada de la cepa con una torunda estéril, se estandarizó la concentración de bacterias; para ello se introdujo la torunda estéril en un tubo con 5mL de solución estándar, y se comparó su turbidez contra la de un estándar en la escala de McFarland.
3. Se procedió a realizar rayados de la cepa estandarizada de *S. mutans* con torundas estériles en la placa de Petri con agar tripticasa de soya, tomando el caldo preparado del tubo de ensayo con la punta de la torunda, con un movimiento de lado a lado, logrando así cubrir toda la placa.
4. Se incubó la placa por 24 horas, con una temperatura de 37 °C , finalizado el tiempo de incubación; se observó el crecimiento de las bacterias en las placas, y se evaluó si los extractos tuvieron o no efecto antimicrobiano, por medio del diámetro del halo. Cuando se recolectaron todas las muestras, se determinó un promedio por cada halo de inhibición.

Figura N° 32. Inoculación de la bacteria con una turbulencia similar al estándar de McFarland



Fuente: E.A.P. de microbiología (2014).

Figura N° 33. Preparación de las placas sometidas al ensayo microbiológico en una cámara de flujo laminar



Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Obtención de los extractos de la fruta *Rubus spp*

La información y los resultados correspondientes en este capítulo son adquiridos en el desarrollo investigativo de cada variable, según los objetivos específicos establecidos. Se ordena de una manera ordenada con respecto a cómo se fue realizando cada uno de los pasos. Esta sección tiene como propósito analizar la actividad antibacteriana de la *Rubus spp* frente a cepas de *S. mutans*.

La primera etapa de la investigación se realizó con la recolección del material vegetal, el cual se sometió a un proceso de selección, eliminando material extraño y bayas en mal estado; seguidamente se realizó una limpieza con agua y papel toalla. La fruta es utilizada de manera fresca; sin embargo, según datos reportados, el contenido de polifenoles se mantiene aún después de un mes de congelación; posteriormente de tres meses disminuye solamente un 11%. (Quirós, 2016).

En la figura 34 se observa el paso de selección del material utilizado en el método de maceración.

Figura N° 34. Muestra del fruto de mora (*Rubus spp*) recolectado, seleccionado, lavado y seco, utilizado para la elaboración de la investigación



Fuente: Elaboración propia.

El método de maceración es un proceso que lleva un tiempo prolongado; sin embargo, es una forma sencilla y económica, con la capacidad de extraer la mayor cantidad de propiedades de lo que se macera, prácticamente en su totalidad, sin necesidad de alterarla por efectos de temperatura. (Castro, 2018). Es necesario, en la muestra, conocer que del tamaño de la partícula dependerá el rendimiento de la extracción; la transferencia de masa de la extracción se mejora si se utiliza un tamaño de partícula pequeño, facilitando la penetración del disolvente. (Quirós, 2016, p. 16).

La mezcla se tapó y se almacenó durante 15 días, con etanol al 70%. Quirós (2016, p. 14) menciona que, para la extracción de polifenoles de los frutos, como la mora, se utilizan disolventes orgánicos puros o combinados (etanol-agua) en diferentes proporciones. Además, según la FDA, menciona que el grupo 1, conformado por etanol, acetona y acetato de etilo, puede ser utilizado en el proceso de alimentos bajo las buenas prácticas. Se almacenó en un lugar donde no tuviese contacto con la luz, para evitar algún tipo de descomposición producto de oxidaciones de los compuestos. Posteriormente a este

lapso, se procedió a filtrar el extracto con un embudo büchner y kitasato, utilizando papel filtro y una bomba de vacío, para eliminar la presencia de cualquier material sólido que pudiera interferir los análisis de los extractos.

Por otro lado, se determinaron las características organolépticas de los extractos acuosos, las cuales se describen a continuación, en la tabla 1.

Tabla 1. Características organolépticas del extracto de *Rubus spp*

Característica Organoléptica	Extracto de <i>Rubus spp</i>
Apariencia	Líquido fluido
Color	Vino
Olor	Dulce, característico de la mora

Fuente: Elaboración propia.

Después de aplicar la técnica de maceración, el extracto etanólico presentó características físicas de coloración morado oscuro, con olor dulce, y característico de la mora. Su consistencia y particularidades se mantuvieron iguales, aún luego de la filtración al vacío. Al siguiente día se trasvasó a un balón de 500ml compatible al rotavapor.

Figura N° 35. Volumen del extracto de *Rubus spp* en probeta 500 ml



Fuente: Elaboración propia.

Pruebas de Identificación para el Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Obtenidos de *Rubus spp*

En la elaboración del tamizaje fitoquímico de los componentes activos de la fruta mora, se tomaron en cuenta todas las pruebas para obtener resultados más completos, por lo que se analizó existencia del extracto etanólico, de: cumarinas, triterpenos, antraquinonas, taninos, terpenos, almidón, saponinas, alcaloides, flavonoides y azúcares reductores, según el procedimiento descrito en la metodología de la obtención de extractos de las fases acuosas (AQ1 Y AQ2), a partir de AQ2 (AQ2E y AQ2A) y etéreas (E). En la tabla 2 se puede observar un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 2. Resultados obtenidos durante el tamizaje Fitoquímico de los Extractos de *Rubus spp*

Prueba	Identificación	Característica de presencia	Extracto	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado anaranjado	E	+
			AQ1	-
			AQ2E	-
Shinoda	Flavonoides	Coloración de rojo oscuro a rosado	E	++
			AQ2E	+++
KOH	Cumarinas	Coloración verde alrededor de la muestra	E	+
			AQ2E	-
Lieberman Burchard	Triterpenos y Esteroles	Anillo marrón o verde esmeralda	E	-
			AQ2E	-
Borntrager-Kraus	Antraquinonas	Rojo oscuro	E	-
			AQ2E	-
			AQ2A	-
FeCl ₃	Taninos	Azul o verde	E	++
			AQ1	+++
Cromatografía (TLC)	Terpenos	Manchas, azules o moradas	E	-
Lugol	Almidón	Azul	AQ1	-
Espuma	Saponinas	Presencia de Espuma	AQ1	-
Benedict	Azúcares reductores	Precipitado rojo ladrillo	AQ1	+++

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

Fuente: Elaboración propia.

A partir de los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico elaborado a la fruta de mora, que se muestra en la tabla 2, se puede afirmar que los metabolitos secundarios presentes en mayor cantidad en la fruta corresponden a taninos, flavonoides, y los que están presentes en menor número corresponden a alcaloides y azúcares reductores. Se puede afirmar, además, que en las pruebas llevadas a cabo, el fruto de la mora no muestra la presencia de terpenos, triterpenos, antraquinonas y polisacáridos como el almidón.

Wada y Boxin (2002, p. 3496) reportaron para cinco especies de las más comercializadas de este género como *R. Idaeus*, *R. occidentalis*, *R. ursinus*, *R. laciniatus*, *R. Idaeus*, en el cual se realizó el estudio con 500g de cada baya, se hicieron diferentes extracciones con distintas diluciones de acetona y metanol, donde se logró obtener la presencia de antocianinas.

Jacques & Zambiasi (2011, p. 251) mencionan que en Brasil, *Rubus spp* tiene un fuerte estudio en el campo de la industria alimentaria y farmacéutica, por sus aportes nutricionales; además, por la presencia de sus metabolitos secundarios como flavonoides, las antocianinas presentan una amplia capacidad de reacción con los radicales libres, permitiendo contribuir a la prevención de diversas enfermedades, teniendo al mismo tiempo un efecto antimicrobiano. *Rubus spp* se caracteriza por su presencia de ácido elágico y algunas elagitaninas, que han demostrado propiedades inhibitorias contra la replicación del virus VIH; también se menciona que diferentes extractos de mora pueden prevenir la metástasis de algunos tipos de cáncer como uterino, pulmón, mama, próstata y oral.

Jacques & Zambiasi (2011, p. 249) mencionan que, en un estudio en ratas, las antocianinas extraídas de la mora fueron capaces de reducir la cantidad y el tamaño de tumores malignos; esto se da por la capacidad que tienen en su estructura para ejecutar una acción antioxidante, pudiendo donar electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres.

Jacques & Zambiasi (2011, p. 152) mencionan que los principales efectos son determinados por las siguientes antocianidinas: cianidina-3-arabinósido, cianidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glicósido, cianidina-3-xilosido,

cianidina-3-rutinósido, cianidina-malonoilglicósido, cianidina-dioxaloil-glicósido, peonidina-3-glicósido y malvidina-acetilglucósido. En términos de cantidad, el 80% de las antocianinas totales están en forma de cianidina-3-glucósido.

Martínez, Arévalo, Verde, Rivas, Oranda, Nuñez & Morales (2011, p. 68) lograron determinar la presencia y cuantificación de flavonoides y antocianinas en la mora, *Rubus adenotrichus* recolectada en Costa Rica. Martínez (2012, p. 28) determina la presencia de taninos con la prueba de cloruro férrico, al mismo tiempo que la presencia de flavonoides, alcaloides, donde se logra percibir una concurrencia con los resultados obtenidos y los resultados obtenidos en otras investigaciones.

A diferencia de que cada investigación se realizó con distintos solventes para la extracción y metodologías diferentes, se logra comprobar la misma teoría en cada proceso, con la misma identificación de metabolitos secundarios, a pesar de que esto se puede ver modificado por distintas características como zona geográfica, clima, estado de maduración, entre otras.

Según Rauha et al. (2000), también se ha demostrado la estabilidad de la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos de bayas a través del tiempo de almacenamiento, la cual fue altamente estable frente a *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, entre otras.

En el estudio realizado por Guevara (2018), logró demostrar que el extracto natural del fruto de *Rubus* a diferentes concentraciones, presenta efecto inhibitorio *in vitro* frente a cepas de *S. aureus* aisladas en pacientes del hospital Regional Docente de Perú, atribuyendo este efecto no solo a un compuesto, sino más bien a la acción conjunta de diferentes moléculas, determinando los componentes fenólicos con propiedades antibacterianas como: elagitaninos, ácidos elágicos, flavonoides.

Resultados de las pruebas microbiológicas.

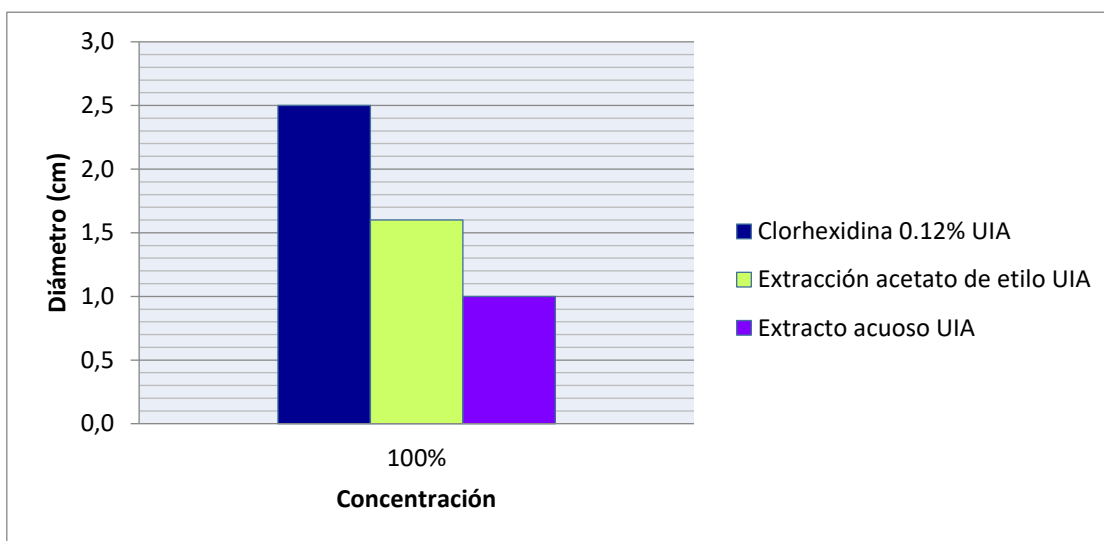
Una vez realizados los cultivos en placas de agar tripticasa de soya con la bacteria *S. mutans* a una temperatura de 37 °C, durante un proceso de 24 a 48 horas en distintos laboratorios, se logran determinar los siguientes resultados, que se obtuvieron después de la medición del halo alrededor de cada orificio, que contiene las concentraciones de cada prueba:

Tabla 3. Resultados obtenidos durante la determinación antimicrobiana de los extractos de *Rubus spp*, frente *S. mutans* en el laboratorio microbiológico de la UIA

Sustancia	Halo de inhibición (cm)
1º Clorhexidina 0.12%	2,6
2º Clorhexidina 0.12%	2,6
3º Clorhexidina 0.12%	2,4
1º Extracto acuoso	1,0
2º Extracto acuoso	1,0
3º Extracto acuoso	1,0
1º Acetato de etilo 100%	1,6
2º Acetato de etilo 100%	1,6
3º Acetato de etilo 100%	1,8
1º Diclorometano 100%	0,0
2º Diclorometano 100%	0,0
3º Diclorometano 100%	0,0
1º Suero fisiológico	0,0
2º Suero fisiológico	0,0
3º Suero fisiológico	0,0

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 1. Determinación del halo inhibitorio (cm) obtenido al aplicar los extractos: acuoso, acetato de etilo y diclorometano a una cepa de *Streptococcus mutans*, utilizando como control positivo la clorhexidina al 0.12% y suero fisiológico como blanco negativo, para medir la actividad antimicrobiana en el laboratorio de microbiología de la Universidad Internacional de las Américas



Fuente: Elaboración propia.

En el gráfico anterior se muestran los diámetros obtenidos de los halos de inhibición contra la cepa de *Streptococcus mutans*, que provocaron los extractos acuoso y acetato de etilo, ambos al 100%, junto con el halo que provocó la clorhexidina al 0.12% como control positivo, obtenidos al realizar las pruebas en el laboratorio de microbiología en la UIA.

Estos resultados obtenidos demuestran la alta actividad que tiene la clorhexidina al 0.12% contra este microorganismo, justificando su uso como control positivo, que supera a los extractos acuoso y de acetato de etilo, que se pusieron a prueba, y que generaron algún halo de inhibición. Sin embargo, estos resultados, obtenidos para los extractos, son muy alentadores, debido a que el extracto en acetato de etilo logró un halo de inhibición de 1,6 cm, lo que demuestra que sí existe actividad contra el de *Streptococcus mutans*, y que

generando un proceso de semipurificación o purificación, esta actividad podría potenciarse y obtener halos más grandes, ya que se estaría concentrando la presencia de el o los compuestos responsables de dicha actividad. Este mismo principio puede pensarse para el extracto acuoso, que, aunque no tiene tanta actividad como el extracto en acetato de etilo, sí presenta un resultado que podría mejorarse considerablemente.

Los resultados, anteriormente mencionados, se obtuvieron con base en un plan experimental a cargo del ingeniero Carlos Castro Mejías, quien, debido a su amplia experiencia en estos análisis, y tomando en cuenta el material y equipo con el que cuenta la universidad, estableció un plan piloto, para determinar la actividad antiparasitaria en los laboratorios de microbiología de la UIA. Al ser resultados obtenidos en un plan piloto, estos se deben corroborar con la puesta en práctica en un laboratorio, que cuente con el equipo necesario y la experiencia de este tipo de análisis. Para cumplir con esto, se elaboró el mismo análisis en las instalaciones del centro de microbiología Microlabs, ubicado en Guadalupe de Goicoechea, para comparar y validar, de alguna manera, los resultados obtenidos experimentalmente en la UIA.

Los resultados obtenidos en esta comprobación se muestran en la siguiente tabla:

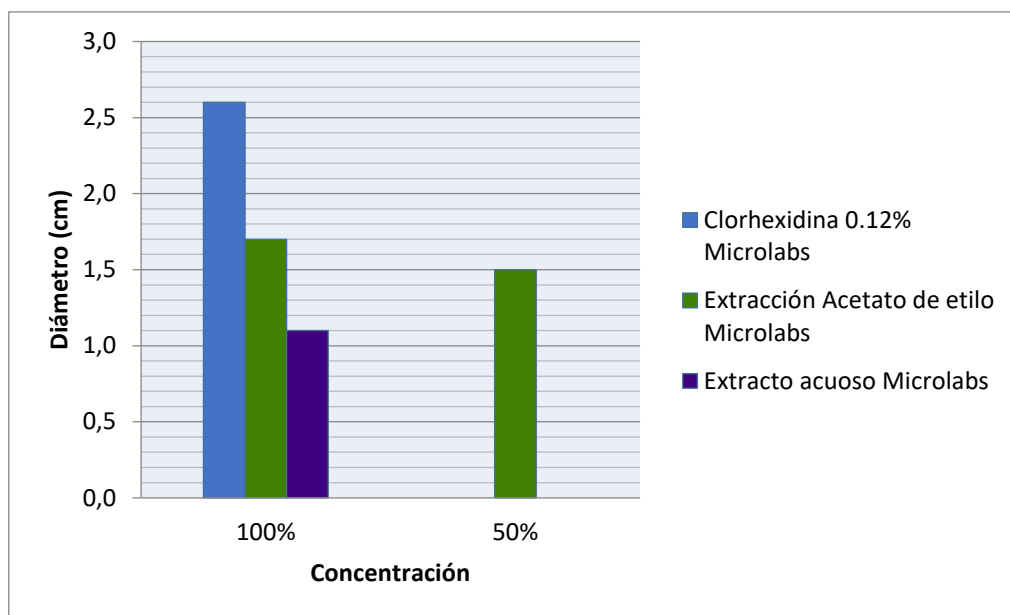
Tabla 4. Resultados obtenidos durante la determinación antimicrobiana de los extractos de *Rubus spp*, frente *S. mutans* en el laboratorio microbiológico de Microlabs

Sustancia	Halo de inhibición (cm)
Clorhexidina 0.12%	2,6
Clorhexidina 0.12%	2,8
Clorhexidina 0.12%	2,6
Clorhexidina 0.12%	2,4
Extracto acuoso 100%	1,1

Extracto acuoso 100%	1,0
Extracto acuoso 100%	1,2
Extracto acuoso 100%	1,0
Extracto acuoso 50%	0,0
Extracto acuoso 50%	0,0
Extracto acuoso 50%	0,0
Extracto acuoso 50%	0,0
Extracto acuoso 25%	0,0
Extracto acuoso 25%	0,0
Extracto acuoso 25%	0,0
Extracto acuoso 25%	0,0
Acetato de etilo 100%	1,6
Acetato de etilo 100%	1,8
Acetato de etilo 100%	1,8
Acetato de etilo 100%	1,6
Acetato de etilo 50%	1,4
Acetato de etilo 50%	1,6
Acetato de etilo 50%	1,5
Acetato de etilo 50%	1,5
Acetato de etilo 25%	0,0
Acetato de etilo 25%	0,0
Acetato de etilo 25%	0,0
Acetato de etilo 25%	0,0
Diclorometano 100%	0,0
Diclorometano 100%	0,0
Diclorometano 100%	0,0
Diclorometano 100%	0,0
Diclorometano 50%	0,0
Diclorometano 50%	0,0

Diclorometano 50%	0,0
Diclorometano 50%	0,0
Diclorometano 25%	0,0
Diclorometano 25%	0,0
Diclorometano 25%	0,0
Diclorometano 25%	0,0
Dimetil sulfóxido al 10%	0,0
Dimetil sulfóxido al 10%	0,0
Dimetil sulfóxido al 10%	0,0
Dimetil sulfóxido al 10%	0,0
Suero fisiológico	0,0
Suero fisiológico	0,0
Suero fisiológico	0,0
Suero fisiológico	0,0

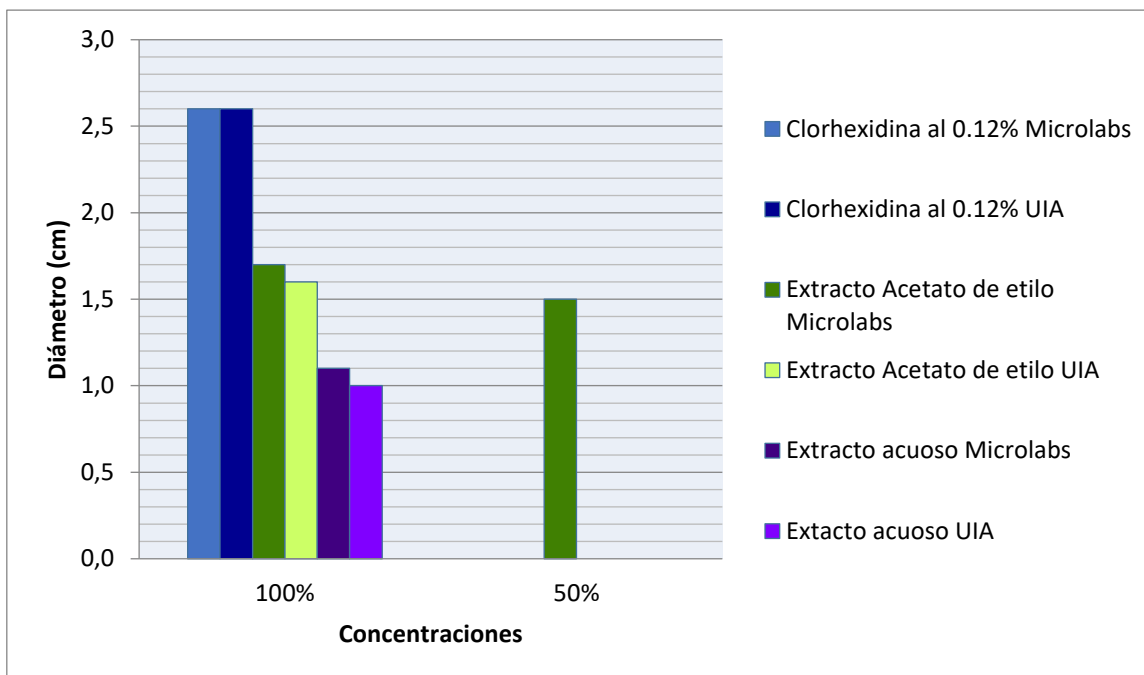
Gráfico 2. Determinación del halo inhibitorio (cm) obtenido al aplicar los extractos: acuoso, acetato de etilo y diclorometano a una cepa de *Streptococcus mutans*, utilizando como control positivo la clorhexidina al 0.12% y suero fisiológico como blanco negativo, para medir la actividad antimicrobiana en el laboratorio Microlabs en Guadalupe de Goicoechea



Fuente: Elaboración propia.

En el grafico anterior se indica el diámetro de los halos de inhibición de los diferentes extractos con concentraciones del 100% y al 50% del extracto acuoso, extracción con acetato de etilo y la clorhexidina al 0.12%, realizados con el equipo del laboratorio de microbiología Microlabs Guadalupe.

Gráfico 3. Determinación del halo inhibitorio (cm) obtenido al aplicar los extractos: acuoso, acetato de etilo y diclorometano a una cepa de *Streptococcus mutans*, utilizando como control positivo la clorhexidina al 0.12% y suero fisiológico como blanco negativo, para medir la actividad antimicrobiana en ambos laboratorios de microbiología



Fuente: Elaboración propia.

Al comparar los resultados de ambos laboratorios, se demostraron datos relativamente homogéneos, por lo que se puede sospechar que los resultados obtenidos con el método experimental aplicado en la UIA son congruentes con los obtenidos con el laboratorio de microbiología, dejando la posibilidad de poder repetir este tipo de análisis en la Universidad Internacional de las Américas con otras plantas y otros microorganismos.

Sin embargo, el efecto antimicrobiano de la mora en *S. mutans* todavía no es evidenciado, pero su efecto antimicrobiano, manifestado en esta investigación, demuestra en las pruebas que su efecto como inhibidor bacteriano puede darse por la presencia de metabolitos secundarios de los diferentes tipos de taninos y flavonoides encontrados ampliamente en el estudio. Sin embargo, para los resultados negativos, en este tipo de prueba, el diámetro del halo obtenido no solo depende de la sensibilidad del microorganismo, sino también de la cantidad de disolución añadida al orificio, el grosor de la capa de agar, composición, la magnitud de difusión de la molécula en el medio, la

temperatura y atmósfera de incubación, velocidad de duplicación bacteriana, el tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria- (Asterán, Corso & Galas, 2003, p. 8).

Al realizar ambas metodologías en dos laboratorios distintos, se pueden obtener resultados más amplios, dando a conocer el efecto inhibitorio frente al *S. mutans*, lo que permite, en primer plano que esta metodología es simple y precisa, y eso deja pensar que las instalaciones de microbiología de la UIA permiten desarrollar un procedimiento microbiológico de gran alcance, al comparar las respuestas con un laboratorio microbiológico.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una vez presentados los resultados obtenidos en la ejecución de la investigación, donde se pretendía determinar la efectividad *in vitro* de la *Rubus spp*, frente la bacteria *Streptococcus mutans* por medio de halos de inhibición, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

- Por medio del tamizaje fitoquímico realizado a la fruta *Rubus spp* se logra comprobar la presencia de metabolitos como flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas y azúcares reductores, y que poseen efectos beneficiosos para la salud, como agentes antimicrobianos.
- Existe efecto antibacteriano *in vitro* del colutorio de clorhexidina al 0,12%, con un halo de inhibición promedio de 2.6 cm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.
- Existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso al 100% UIA de la *rubus spp*, con un halo de inhibición promedio de 1,0cm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.
- Existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso al 100% MICROLABS de la *rubus spp*, con un halo de inhibición promedio de 1,1 cm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.
- Existe efecto antibacteriano *in vitro* de la extracción de acetato de etilo al 100% MICROLABS, con un halo de inhibición promedio de 1,7cm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.
- Existe efecto antibacteriano *in vitro* de la extracción de acetato de etilo al 100% UIA con un halo de inhibición promedio de 1,6cm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.
- La extracción de acetato de etilo al 50% MICROLABS obtuvo un halo de inhibición promedio de 1,5cm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.

- No existe efecto antibacteriano *in vitro* en el extracto acuoso al 50% y al 25%, ni para la extracción con diclorometano en concentraciones al 100%,50%,25%, y en concentraciones al 25% de la extracción con acetato de etilo.
- La técnica de Kirby Bauer facilita el proceso de la investigación, al ser un método que permite la elaboración de un análisis sencillo, fácil y económico, con resultados específicos sobre el efecto antibacteriano de los extractos en un corto tiempo.
- Los resultados obtenidos, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Internacional de las Americas y los del laboratorio clínico Microlabs, no varían significativamente, lo que permite analizar las instalaciones de la UIA como una herramienta importante en futuras investigaciones.
- El análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de los extractos acetato de etilo y acuoso al 100%, realizados en el Laboratorio de Microbiología de la UIA y en el laboratorio MICROLABS, demostró que ambos métodos son semejantes entre sí.
- Los resultados obtenidos en los laboratorios de microbiología de la UIA, generan una excelente posibilidad para poder realizar más análisis de este tipo, en las instalaciones de la universidad, y promover la investigación en futuras tesis.

Recomendaciones

- A los estudiantes de Farmacia que deseen continuar con la investigación, probar, con la determinación del efecto antimicrobiano del extracto de mora combinado con otro material vegetal, con el fin de estudiar su efecto.

- A los interesados en realizar una continuación en el proceso investigativo de los extractos del fruto de mora, haciendo una purificación o semipurificación de los componentes responsables del efecto antimicrobiano obtenido, permite evaluar de manera aislada su efecto antimicrobiano.
- A los estudiantes de Farmacia que deseen realizar una investigación con plantas y frutos, indagar acerca de otros métodos de extracción de los metabolitos secundarios.
- A la Universidad Internacional de la Américas, invertir en un laboratorio de microbiología con las condiciones mínimas necesarias para realizar este tipo de análisis, y promover la generación de nuevos proyectos de investigación y tesis en esta línea
- A los interesados en continuar con la investigación, realizar otros posibles métodos alternativos para pruebas de sensibilidad.

REFERENCIAS

- Atención integrada a las enfermedades prevalentes de la infancia (Aiepi). (2009). Salud Oral <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/si-oral1.pdf>.
- Arias, M., Reyes, U. Araujo, O & Leitón, F. (2012). Forma farmacéutica a base de nanopartículas de plata con efecto cicatrizante en la epidermis, formuladas a partir de nitrato de plata, *mentha piperita*, *lamiaceae* (menta) y *croton draco*, *euphorbiaceae* (targuá). (2019).
- Arango, G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. (2008). https://www.academia.edu/4274958/alcaloides_farmacognosia_II.
- Bascones, A. & Morante, S. (2006) Antisépticos orales perspectiva actual. Tomado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852006000100004.
- Bascones, A., Mudarra, S. & Perea, E. (2002). Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v14n3/original1.pdf>
- Ballester N. (2014). Agentes antimicrobianos alternativos de origen natural con acción inhibitoria de *S. mutans* como mecanismo de desinfección de las preparaciones cavitarias dentales http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2149/Cosco_rdpdf?sequence=1&isAllowed=y
- Castro, J. & Cerdas, M. (2005). Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Mora (*Rubus* spp) Cultivo y manejo Poscosecha.
- Carrillo, C (2013). Diagnóstico de lesiones incipientes de caries. <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2010/od101d.pdf>
- CNP (2013). Monitoreo de mercados de mora. Sistema de información agroalimentaria. Boletín 01-2013.
- Cosco, D. (2010) Actividad inhibitoria del crecimiento de *S. mutans* y de la flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla manzanilla*.

- Correia Pinto, M. (2013). Cumarinas: Versatilidad estructural y aplicaciones en química farmacéutica, rep_575.pdf
- 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 Yucay (Cusco)
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7121/Colina_ra.pdf?sequence=1.
- Casals, E & Peidró. (2009). Guía de salud bucal. 2009, del Consejo general de colegios de farmacéuticos. Sitio web:
https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Documents/Guia%20Salud%20Bucodental_2008.pdf
- Emperatriz, I. Diferenciación morfológica de seis cultivares de mora. (2018).
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15161/1/T-UCE-0004-A80-2018.pdf>
- Federación Dental Internacional (FDI). (2015). El desafío de las enfermedades bucodentales
https://www.fdiworldddental.org/sites/default/files/media/documents/book_sp_reads_oh2_spanish.pdf
- García-Godoy, F. & Hicks, M. (2008) Maintaining the integrity of the enamel surface. [https://jada.ada.org/article/S0002-8177\(14\)63879-4/fulltext](https://jada.ada.org/article/S0002-8177(14)63879-4/fulltext)
- García & Reyes (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica.
<https://www.redalyc.org/pdf/432/43211937005.pdf>
- García, Sánchez, Galindo & Cristema. ¿Tiene un riesgo verdadero para la salud? (2016). <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.24102>.
- Alfonzo, N., Rodríguez, J. & Morales, A. (2009) Caries dental y factores de riesgo en adultos jóvenes.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072009000300004.
- Grabek-Lejko, D. & Wojtowicz, K. (2014). Comparison of antibacterial and antioxidant properties of fruits and leaves of blackberry (*Rubus plicatus*) and raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

- Gutiérrez, G. (2017). Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2018/ims1811.pdf>
- Guevara. (2018). Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural de *Rubus glaucus* “mora andina” sobre *Staphylococcus aureus* aislada del Hospital Regional Docente Las Mercedes, Chiclayo.
<http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/2940/BC-TES-TMP-1757.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Haminiuk, C., Maciel, G., Oviedo, M. & Peralta, R. Phenolic compounds in fruits. (2012).
<https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Huang, R., Li, M. & Gregory, R.L. (2011) Bacterial interactions in dental biofilm
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/viru.2.5.16140>
- Hurtado. (2013). Actividad antibacteriana de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* frente a clorhexidina. de SCIELO Sitio web:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200006.
- Implantec. (2018). Problemas dentales más frecuentes.
<https://www.implantec.net/problemas-dentales-mas-frecuentes-en-costa-rica/>
- Jacques & Zambiasi (2011) Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp).
<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744100025.pdf>
- Kaume, L., Howard, L.R. & Devadeddy, I. (2012) The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and food Chemistry*.
- Miñana, V. El flúor oral para la prevención de caries, ¿cómo, cuándo y a quién? Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Infantil La Fe. Valencia. España http://archivos.fapap.es/files/639-789-RUTA/09%20FAPap_2_2012.pdf.
- Milena, D. & Hernandez, Y. (2006) Diseño y valoración de un medio de cultivo selectivo para *Streptococcus mutans*.
<https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis162.pdf>

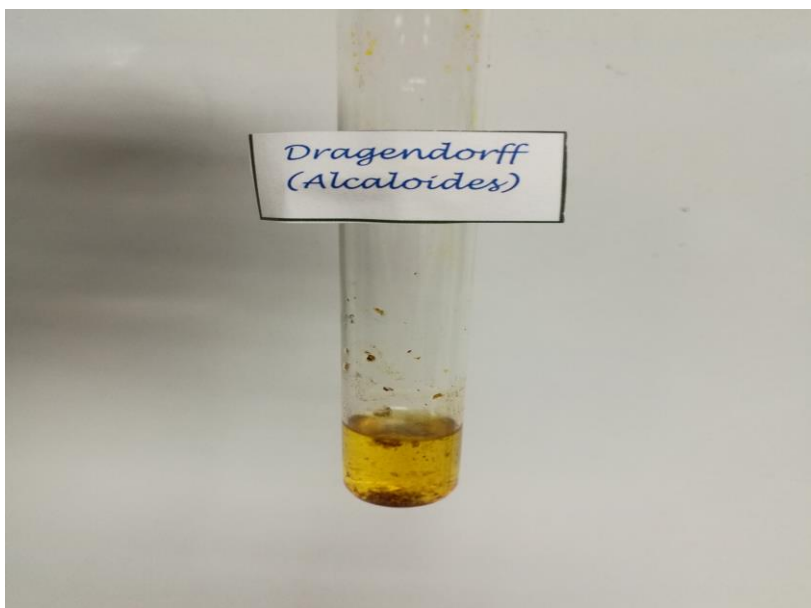
- Montero, O., Ulate, J. & Elías, A. (2011). (2011) Prevalencia de caries dental en niños y niñas escolares de 12 años de edad en Costa Rica. Revista científica odontológica, Vol. 7, Núm. 2.
- Montealegre, C. (2011). Etnobotánica preliminar del espíngo (ocotea quixos (lam. kosterm.) en la medicina tradicional indígena inga, pruebas fitoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana.
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8875/tesis813.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Muñoz, F. (2016) Identificación de grupos funcionales y taninos naturales. Laboratorio de química. Ingeniería forestal-régimen anual.
- Núñez, D. & García, L. (2010). Bioquímica de la caries dental.
<http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n2/rhcm04210.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (s.f.). Exceso o cantidad inadecuada de flúor. https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/fluoride/es/
- Ojeda, J., Oviedo, E. & Salas, A. (2013). Streptococcus mutans y caries dental :
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005.
- Pacho, L. (2015). Eficacia, seguridad y efectos adversos de los agentes químicos antiplaca.
- Suárez Salgado, P.V. (2017). “Efecto antimicrobiano de Psidium guajava (guayaba) sobre cepas de streptococcus mutans. estudio in vitro”. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Odontología. Sitio web: WebPage-1.pdf.
- Pasterán, P. Corso, A. & Galas, M. (2003). Manual de Procedimiento Salmonella: Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Ministerio de Salud, Buenos Aires.
- Pérez, Duque de Estrada & Hidalgo (2007) Asociación del Estreptococo mutans y lactobacilos con la caries dental en niños.
<file:///Users/dianayasmin/Desktop/Asociación%20del%20Estreptococos%20mutans%20y%20lactobacilos%20con%20la%20caries%20dental%20en%20niños.webarchive>.
- Núñez, P. D. & García, L. (2010). Bioquímica de la caries dental.
<https://www.redalyc.org/pdf/1804/180414048004.pdf>

- Pino, N., Álvarez, R. & Prado, G. (2017). Determination of secondary metabolites by thin layer chromatography on species with ethnomedicinal use as a pedagogical strategy in the classroom.
- Porras, M. (2012). Síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano funcionalizadas con extracto de la mora y su evaluación preliminar como agentes antimicrobianos. LANOTEC, Costa Rica. Sitio web: Dialnet-SintesisDeNanoparticulasPolimericasDeQuitosanoFunc-5069934.pdf
- Quirós, A. (2016). Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de la mora.
<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3619/1/39733.pdf>
- Quisillo, J. (s.f.). Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del Escobillón Rojo.
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3097/1/56T00409.pdf>.
- Rauha Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M. Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology.
- Reyes, R., Ubaldo, D. & Araujo, A. (2012). Los flavonoides y el sistema nervioso central. <http://www.scielo.org.mx/pdf/sm/v35n5/v35n5a4.pdf>
- Riaz, M., Ahmad, M. & Rahman, N. (2011). Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, <http://www.academicjournals.org/JMPR>^[1]_{SEP}
- Rivera E. (2003). La hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Revista de Fitoterapia.
- Sánchez, M. (2014). Efecto antimicrobiano de mora y la miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Lactobacillus casei* y *Sacharomyces cerevisiae* y su aplicación en la formulación de una bebida.
- Shyla J. (2011). Antimicrobial Activity of Few Medicinal Plants against Clinically Isolated Human Cariogenic Pathogens. ISRN Dentistry.
- Silva, J. & Siqueira, A. (2000). Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100007.

- Martínez, S., Arévalo, K., Verde, M., Rivas, C., Oranda, A., Nuñez, M., Morales, M. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichos* Schltdl (zarzamora).
- Soto-Huamani, H.M.P. (2014). *Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del Zea Mays L. (maíz morado), Rubus glaucus (mora andina); Opuntia soherensii (ayrampo) y Diseño de un gel de limpieza cutánea* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
- 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.
- Struzycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries.
<http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6322014127.pdf>
- Vargas, D. (2004) Análisis de flavonoides en plantas del sur de Chile con técnica Hplc. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fcv288a/pdf/fcv288a.pdf>
- Villalobos, R. (2016) Odontología vital.
https://ulatina.ac.cr/comunidad/odontologia/ODONTOLOGIA%20VITAL%20EDICION_ESPECIAL.pdf
- Wada & Boxin. (2002). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Oregon Caneberries. <https://sci-hub.tw/10.1021/jf011405l>
- Gallardo, W. (2017). Estudio epidemiológico de la Salud Oral del Adulto Mayor en Costa Rica, 2016- 2017, de Caja Costarricense de Seguro Social. Sitio web: <https://repositorio.binasss.sa.cr/repositorio/bitstream/handle/20.500.11764/633/oral.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Yuste, J. & Fung, C. (2004). Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. *Journal and Food Protection*. (67.2). pp.371-377.
- Zapata, J. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales.
- Zero, D., Fontana, M., Martínez-Mier, Ferreira-Zandona, Ando, M., González, C., & Bayne, S. (2009). The Biology, Prevention, Diagnosis and Treatment of Dental Caries: Scientific Advances in the United States
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002817714634693>

ANEXOS

Anexo 1. Resultado positivo de la aplicación de pruebas de alcaloides con reactivo de Dragendorff al extracto: E



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 2. Aplicación de pruebas de flavonoides con extracto E y AQ2E



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 3. Desarrollo de la prueba KOH para la determinación de Cumarinas al extracto E



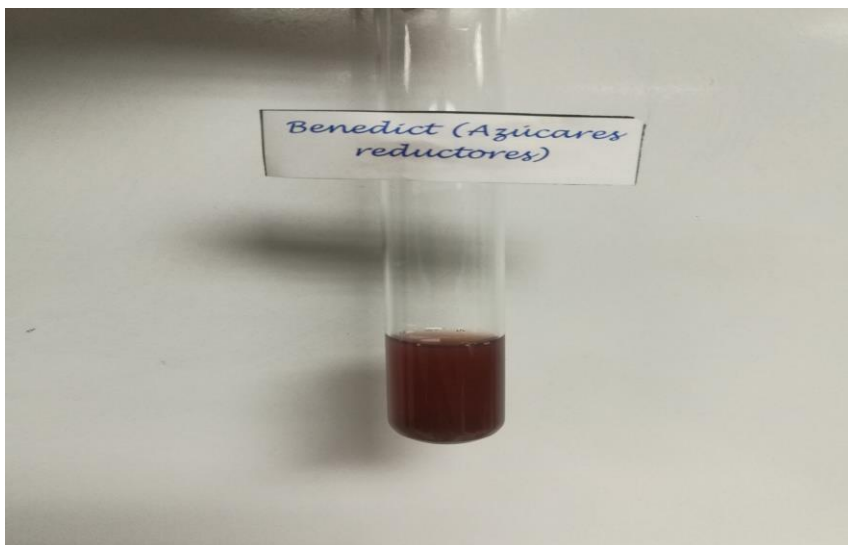
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 4. Desarrollo de la prueba de taninos para la identificación en los extractos E y AQ1.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 5. Identificación de azúcares reductores en el extracto AQ1 para comprobar la presencia de azúcares reductores



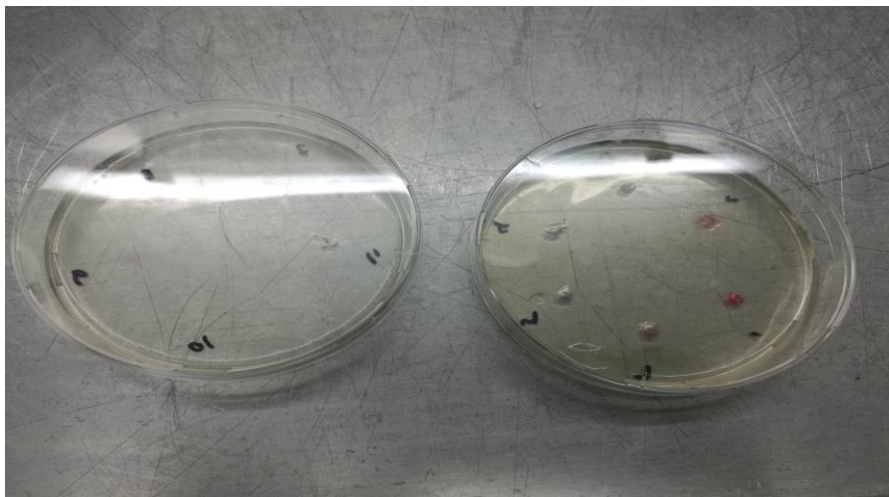
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 6. Prueba de sensibilidad Microbiana de *S. mutans* frente a extracciones de *Rubus spp* UIA



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 7. Prueba de sensibilidad Microbiana de *S. mutans* frente a extracciones de *Rubus* spp, en el laboratorio clínico Microlabs



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 8. Autoclave utilizada en Clínica Visan, para la esterilización utilizada en las pruebas microbiológicas de la UIA



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 9. Promedios obtenidos de los halos de inhibición

Sustancia	Promedio halo de inhibición (cm)
Clorhexidina 0.12%	2,6
Clorhexidina 0.12%	2,6
Extracto acuoso 100% UIA	1,0
Extracto acuoso100% MICROLABS	1,1
Acetato de etilo 100% UIA	1,6
Acetato de etilo 100% MICROLABS	1,7
Acetato de etilo 50% MICROLABS	1,0