

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**



TESIS

**"EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE INFUSIÓN DE MANZANILLA
(*Matricaria chamomilla*) SOBRE *Streptococcus mutans* - PUNO 2013"**

PRESENTADA POR:

MIRELIA JANETH TALAVERA APAZA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIAS DE LA SALUD



PUNO, PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
● BIBLIOTECA CENTRAL AREA DE TESIS
Fecha Ingreso: 14 JUL 2015
Nº 839

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

**“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE INFUSIÓN DE MANZANILLA
(*Matricaria chamomilla*) SOBRE *Streptococcus mutans* – PUNO 2013”**

PRESENTADA POR:

MIRELIA JANETH TALAVERA APAZA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIAS DE LA SALUD

PUNO, PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
TESIS

**“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE INFUSIÓN DE MANZANILLA
(*Matricaria chamomilla*) SOBRE *Streptococcus mutans* – PUNO 2013”**

PRESENTADA POR:

MIRELIA JANETH TALAVERA APAZA

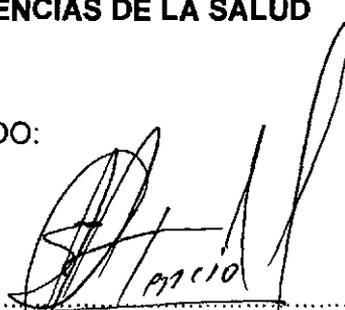
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORIS SCIENTIAE

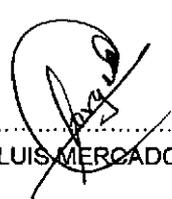
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

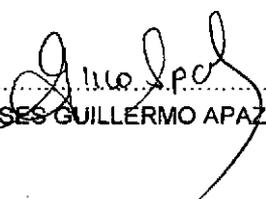
PRESIDENTE


.....
Ph.D. SABINO ATENCIO LIMACHI

PRIMER MIEMBRO


.....
Dr. JORGE LUIS MERCADO PORTAL

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dr. MOISES GUILLERMO APAZA AHUMADA

Puno, 16 de diciembre de 2014

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme siempre.

A mis padres Juana Apaza de Talavera y Enrique Talavera Barriga y a mi hermano Ronal, por su presencia constante en todos los momentos de mi vida.

A mi hijita Ariannita Fransheska por ser la luz de mis días y el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A los Docentes del Doctorado en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional del Altiplano, por los momentos compartidos y por sus conocimientos transmitidos durante el desarrollo del doctorado.

A mis jurados los Docentes-Doctores Sabino Atencio Limachi, Jorge Luis Mercado Portal, Moises Apaza Ahumada, por su ayuda y orientación en la culminación de este trabajo.

Al Docente-Doctor Ramón Serruto Colque, por su ayuda y orientación prestada durante la elaboración del presente trabajo.

A la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional del Altiplano, en la persona de su Director Dr. Rogelio Florez Franco.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para la realización y culminación de este Doctorado.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	lx
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1	Planteamiento del problema	7
1.2	Justificación	10
1.3	Preguntas del problema	11
1.4	Objetivos	12
1.5	Hipótesis	13

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes de investigación	14
	2.1.1 Antecedentes locales	14
	2.1.2 Antecedentes nacionales	14
	2.1.3 Antecedentes internacionales	14
2.2	Marco referencial	20
	2.2.1 Caries dental	20
	2.2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	25
	2.2.3 Prevención y control de la caries dental	28
	2.2.4 <i>Matricaria chamomila</i> (MANZANILLA)	40
	2.2.5 Pruebas de sensibilidad in vitro a los agentes	44

antimicrobianos: susceptibilidad de difusión en agar

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1	Nivel y tipo de investigación	47
3.2	Diseño de investigación	47
3.3	Grupos de estudio	48
	3.3.1 Para determinar el efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2%, 4% y 8% de <i>Matricaria chamomilla</i>	48
	3.3.2 Para determinar el perfil de compuestos fenólicos en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i>	48
3.4	Variables	49
	3.4.1 En el efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2% de <i>Matricaria Chamomilla</i>	49
	3.4.2 En el perfil de compuestos fenólicos en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i>	50
3.5	Tratamientos y repeticiones para el análisis del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de <i>Matricaria chamomilla</i>	54
3.6	Descripción de métodos	51
3.7	Determinación del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de <i>Matricaria chamomilla</i>	52
	3.7.1 Identificación de la especie botánica	52
	3.7.2 Recolección, selección, limpieza y desecación de las inflorescencias	52
	3.7.3 Procedimiento para el análisis del test de difusión por disco	54
3.8	Determinación del perfil de compuestos fenólicos de la infusión y del extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i> por HPLC	58
3.9	Análisis estadístico	58

3.10	Ámbito de estudio	59
3.10.1	Ámbito general	59
3.10.2	Ámbito específico	60

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Resultados	62
4.2	Discusión	74
	CONCLUSIONES	81
	RECOMENDACIONES	83
	BIBLIOGRAFÍA	84
	ANEXOS	92

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1 Tratamientos, productos y concentración en estudio para el análisis del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> sobre el <i>Streptococcus mutans</i> .	50
2 Tratamientos, repeticiones y unidades experimentales para el análisis del efecto antibacteriano in vitro de la infusión e <i>Matricaria chamomilla</i> sobre el <i>Streptococcus mutans</i> .	51
3 Efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2%, 4%, 8% de <i>Matricaria chamomilla</i> , del colutorio de clorhexidina al 0,12% y del agua mineral esterilizada sobre el <i>Streptococcus mutans</i> , Puno 2014.	62
4 Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en la infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 2%.	65
5 Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en el extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i> al 2%.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1 Imagen microscópica de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175	24
2 Imagen de microscopio electrónico de <i>Streptococcus mutans</i>	25
3 Clasificación de los metabolitos secundarios en las plantas según su biosíntesis	33
4 Clasificación de los compuestos fenólicos	36
5 <i>Matricaria chamomilla</i>	40
6 Descripción botánica de la <i>Matricaria chamomilla</i>	42
7 Diseño de multigrupos aleatorios	47
8 Inflorescencias de <i>Matricaria chamomilla</i> seleccionadas	53
9 Desecación de las inflorescencias	53
10 Preparación de las infusiones	55
11 Colocación de discos con antimicrobiano	56
12 Repetición 1 de 5 tratamientos	57
13 Repetición 2 de 5 tratamientos	57
14 Repetición 3 de 5 tratamientos	57
15 Perfil cromatográfico por HPLC de la infusión al 2% de <i>Matricaria chamomilla</i>	64
16 Perfil cromatográfico HPLC del extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i>	67
17 Concentración de compuestos fenólicos totales en mg/g muestra en infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i>	69
18 Concentración de tipos de compuestos fenólicos: ácidos fenólicos y flavonoides en mg/g muestra presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i>	70
19 Concentración de tipos de ácidos fenólicos: cafeico y p-cumárico en mg/g muestra presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i>	71

- 20 Concentración de flavonoides: flavanol, flavonol, flavona y flavanona en mg/g muestra en la infusión al 2% y en el extracto de *Matricaria chamomilla* 72
- 21 Concentración de flavonoides: catequina, quercitina, luteolina, apigenina y erodictiol en mg/g muestra en la infusión al 2% y en el extracto de *Matricaria chamomilla* 73

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1	93
Constancia de la desecación de la <i>Matricaria chamomilla</i> y de la preparación de las concentraciones de la infusión, emitida por el Jefe del laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía - Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA – Puno	
2	95
Constancia de identificación y caracterización botánica del material vegetal (<i>Matricaria chamomilla</i>), emitida por el Jefe del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNALM - Lima.	
3	98
Certificado de la cepa ATCC®25175 del proveedor	
4	100
Informe del ensayo de la preparación de las infusiones al 2%, 4% y 8% de <i>Matricaria chamomilla</i> y de la realización del test de difusión por disco para evaluar las propiedades antimicrobianas de la <i>Matricaria chamomilla</i> sobre el <i>Streptococcus mutans</i> , emitido por el Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM – Lima.	
5	105
Informe del resultado del análisis de perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i> por HPLC, emitido por el Jefe del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la UNALM - Lima.	

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano in vitro de infusión de MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) sobre *Streptococcus mutans* - Puno 2013. Se realizaron infusiones al 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla*. Se utilizó como control positivo a la clorhexidina al 0,12% y como control negativo al agua mineral esterilizada. Para determinar el efecto antibacteriano de las infusiones se utilizó la técnica de test de difusión en disco con cinco tratamientos y tres repeticiones. Se realizó además el perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Los resultados mostraron que no hubo efecto antibacteriano in vitro de las infusiones sobre el *Streptococcus mutans*, ya que no presentaron halos de inhibición; sólo la clorhexidina al 0,12% presentó un halo de inhibición de 2.5 mm en promedio. El extracto hidroalcohólico presentó mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación con la infusión al 2% (37,51 y 26,95 mg/g muestra respectivamente). En conclusión, los resultados mostraron que las infusiones de *Matricaria chamomilla*, no presentaron propiedades antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans*, probablemente debido a que la concentración de sus principios activos, responsables de sus propiedades antibacterianas, no están presentes en concentraciones adecuadas y también que existe mayor concentración de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico que en la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla*, aunque, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,01$).

PALABRAS CLAVE. Efecto antibacteriano, infusiones, *Matricaria chamomilla*, *Streptococcus mutans*, HPLC.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the antibacterial effects of chamomile infusion (*Matricaria chamomilla*) on *Streptococcus mutans* - Puno 2013. Infusions were performed at 2% , 4 % , 8 % of *Matricaria chamomilla*. Was used as positive control to 0.12% chlorhexidine as negative control and sterilized mineral water. To determine the antibacterial effect of infusions technique disk diffusion test with five treatments and three replications was used. Phenolics profile infusion at 2% and the hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* by performancia high performance liquid chromatography (HPLC) was also performed. The results showed no antibacterial effect in vitro of the infusions on *Streptococcus mutans*, not as presented inhibition halos; only 0.12% chlorhexidine showed an inhibition zone of 2.5 mm on average. The hydroalcoholic extract showed higher concentration of phenolics infusion compared to 2% (37.51 and 26.95 mg/g sample, respectively) . In conclusion, the results showed that *Matricaria chamomilla* infusions did not exhibit antibacterial properties on *Streptococcus mutans*, probably because the concentration of active principles responsible for their antibacterial properties are not present in suitable concentrations and there is a greater concentration of phenolic compounds in the hydroalcoholic extract infusion in 2% of *Matricaria chamomilla*, although no statistically significant differences ($p>0.01$).

KEYWORDS. Antibacterial effect, infusions, *Matricaria chamomilla*, *Streptococcus mutans*, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La caries dental, ha sido definida como una enfermedad infecciosa, localizada, transmisible, post eruptiva y muy prevalente, de origen multifactorial, que termina con la destrucción de los tejidos duros del diente; cuando el proceso dinámico constante de desmineralización y remineralización en las piezas dentarias, es alterado, por el exceso de producción de ácidos de microorganismos cariogénicos, en combinación con sus factores de virulencia (Liébana, *et. al.*, 2002). Sin ser una enfermedad que comprometa la vida, constituye una de las patologías orales más frecuentes y costosas, con una duración de por vida. La Organización Mundial de la Salud (2003), ha declarado, que se estima que cinco mil millones de personas en el mundo, han sufrido caries dental y que el 60% al 90% de la población escolar sufren de caries dental.

Liébana, *et. al.*, (2002), ha señalado que de las más de 500 especies microbianas que existen en la cavidad oral, los microorganismos cariogénicos son las bacterias que se encuentran en la placa dental, a la que ha definido como una biopelícula formada por microorganismos adheridos entre sí y a una superficie dentaria, embebidos, entremezclados y rodeados de un material extracelular abiótico de un triple origen: bacteriano, saliva y dieta.

Si bien los estudios experimentales en animales y observacionales en humanos, han demostrado que la habilidad de inducir caries dental, no es propiedad exclusiva de una especie en particular, han dejado claramente

establecido que los *Streptococcus mutans* del grupo viridans y los *Lactobacillus spp* son las bacterias cariogénicas más agresivas (Liébana, *et. al.*, 2002, Umar *et. al.*, 2005), por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control se han dirigido hacia la disminución o eliminación de estas bacterias en la cavidad oral (Liébana, *et. al.*, 2002).

Klock y Krasse (1979), compararon diversos tests de actividad de caries, encontrando que solo la frecuencia de caries y los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva, mostraban una correlación significativa con la actividad cariogénica, ilustrando de esta forma el valor del tratamiento antimicrobiano en esta bacteria.

Para el control de la placa dental, se han utilizado agentes mecánicos y químicos; dentro de los agentes mecánicos se encuentra el cepillado y el uso de hilo dental y en los agentes químicos, se encuentran los enjuagues bucales y los dentífricos (Sainz de Net y Ruiz, 2004). El enjuague bucal, es una solución que suele usarse después del cepillado de dientes, para eliminar las bacterias y microorganismos causantes de caries, eliminar el aliento desagradable y mantener así la higiene bucal. Presenta la ventaja de que su actividad antimicrobiana puede alcanzar zonas de difícil acceso. El vehículo más comúnmente utilizado en los enjuagues es el agua y los principios activos son principalmente antisépticos, antibióticos, antifúngicos, astringentes y antiinflamatorios (Marzal, 2012).

Se considera que el *Streptococcus mutans* es sensible a varios agentes antibacterianos utilizados en enjuagues bucales, principalmente a la clorhexidina y triclosán. Estos se emplean preventivamente en el tratamiento de pacientes con alto número de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral, con el propósito de reducir su número y evitar la generación de caries (Bascones y Morante, 2008). No obstante de los beneficios de la clorhexidina, que es el agente antibacteriano más utilizado en enjuagues bucales, se conoce que su uso prolongado o en exceso produce efectos adversos en el organismo y en la estética oral (Baca, Llodra y Junco, 1996).

Además, se ha comprobado estadísticamente que los pacientes que utilizan removedores de placa bacteriana, versus aquellos que sólo utilizan cepillado convencional, presentan un mejor control de la placa en un 75% (Grippaudo, 1995). Por ello, la idea de una sustancia capaz de eliminar fácilmente la placa bacteriana sin efectos secundarios ha sido y continúa siendo objeto de investigación (Marzal, 2012).

Ha surgido de esta forma la necesidad de lograr sustancias antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans* que puedan ser utilizadas como enjuagues bucales y sin tales efectos colaterales. Las plantas y sus propiedades antimicrobianas, son una alternativa válida. El objetivo de estos agentes fitoterápicos es que actúen inhibiendo o eliminando a las bacterias que viven en la placa dental. Las ventajas de su utilización radican en que sus principios activos, que son los compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias

complementarias que van a potenciarse biológicamente entre sí, no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados (Cañigüeral, Dellacassa y Bandoni, 2003).

Una de estas alternativas podría ser la infusión de la *Matricaria chamomilla*, en particular de las cabezas de las flores secas de esta planta. Definiendo a la infusión como una bebida que se obtiene de las partes aéreas (hojas secas, flores y frutos o que contengan sustancias activas volátiles) de varias hierbas o plantas aromáticas a las cuales se vierte agua a punto de hervir y se tapa y se deja reposar durante un tiempo (Anvisa, 2011).

La *Matricaria chamomilla*, ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional, sus propiedades antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans*, han sido investigadas mediante extractos y aceites esenciales demostrándose su acción en el control de la placa dental (Sainz de Net y Ruiz, 2004; Albuquerque *et. al.*, 2010; Rodríguez *et. al.* 2013), sin embargo, la infusión de la *Matricaria chamomilla*, ha demostrado que tiene múltiples beneficios médicos bien conocidos, pero su posible uso como antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans* no reúne muchas referencias. Los mecanismos implicados en las propiedades terapéuticas de la *Matricaria chamomilla*, todavía no se han dilucidado.

Muchas de estas propiedades que se le ha atribuido a la *Matricaria chamomilla* y a las especies vegetales empleadas en la medicina tradicional, para aliviar o curar una serie de dolencias en el hombre, estarían muy relacionadas con los

principios activos que ellas presentan. Por lo tanto, el investigar y conocer el tipo de principios activos presentes en las plantas resulta importante para poder encontrar la relación causa-efecto que ellos producen en la prevención o cura de enfermedades. Troncoso *et. al.*, (2005), ha establecido que estos principios activos no son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto significativo en el curso de un rango de enfermedades.

Dentro de este grupo de principios activos se encuentran a los compuestos fenólicos, que son comúnmente hallados en las plantas, entre sus efectos positivos relacionados y reportados en la literatura figuran el actuar como: antibacteriano (Ezoubeiri *et. al.*, 2005), antimutagénico (Snijman *et. al.*, 2007), entre otras.

Mediante la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y otras pruebas, se ha determinado la presencia de compuestos fenólicos en los extractos y aceites esenciales de la *Matricaria chamomilla* sólo se tiene una referencia de esta determinación en la infusión de *Matricaria chamomilla*; análisis que se considera pertinente e importante en la presente investigación dado que a los compuestos fenólicos se les atribuye propiedades antibacterianas y el análisis comparativo del perfil de compuestos fenólicos presentes en las infusiones y en el extracto de manzanilla podría tener una relación también de causa-efecto de las propiedades antibacterianas de la *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

La presente investigación tuvo como objetivos principales: evaluar el efecto antibacteriano in vitro de infusión de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans* y determinar la variación del perfil de compuestos fenólicos presentes en la infusión y en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*.

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La OMS (2003) ha declarado que se estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental, y que el 60% al 90% de la población escolar en el mundo sufren de caries dental. Por otro lado, la condición de Salud Bucal en el Perú, atraviesa una situación crítica, debido a la alta prevalencia de enfermedades odontoestomatológicas, así tenemos, que la prevalencia de caries dental es del 90%, constituyendo un problema de salud pública. Además, en lo que se refiere a caries dental el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (CPOd), a los 12 años es de aproximadamente 6, ubicándose según la Organización Panamericana de la Salud en un país en estado de emergencia (Ministerio de salud, 2005).

En el departamento de Puno las enfermedades de la cavidad bucal, de las glándulas salivales y de los maxilares, son la segunda causa de morbilidad

registrada en la consulta externa en el año el 2010 (Ministerio de salud, 2010). Por lo que, el nivel actual del conocimiento científico odontológico enfatiza la prevención y el diagnóstico precoz de las patologías bucales, principalmente de las más prevalentes.

Existe consenso en señalar al *Streptococcus mutans* como uno de los microorganismos cariogénicos más importantes. (Liébana, *et. al.*, 2002, Umar *et. al.*, 2005, Duque de Estrada, Pérez e Hidalgo, 2005). Se considera que el *Streptococcus mutans* es sensible a varios agentes antibacterianos, utilizados en enjuagues bucales, principalmente a la clorhexidina y triclosán. No obstante de los beneficios de la clorhexidina, que es el agente antibacteriano más utilizado en los enjuagues bucales, se conoce que su uso prolongado o en exceso produce efectos adversos en el organismo y en la estética oral (Baca, Llodra y Junco, 1996).

Surge de esta forma la necesidad de lograr sustancias antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans* que puedan ser utilizadas como enjuagues bucales y sin tales efectos colaterales. Las propiedades antibacterianas de la *Matricaria chamomilla*, sobre el *Streptococcus mutans*, han sido investigadas mediante extractos y aceites esenciales demostrándose su acción en el control de la formación de la placa bacteriana (Sainz de Net y Ruiz, 2004; Albuquerque *et. al.*, 2010; Rodríguez *et. al.* 2013). La infusión de *Matricaria chamomilla*, ha demostrado también que tiene múltiples beneficios médicos bien conocidos, pero su posible uso como antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans* no reúne muchas referencias.

Muchas de las propiedades que se le atribuye a la *Matricaria chamomilla* y a la variada cantidad de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional para aliviar o curar una serie de dolencias en el hombre estarían muy relacionadas con los principios activos que ellas presentan. Es por eso que en los últimos años una gran parte de la investigación, se ha centrado en estos principios activos, estudiando en detalle tanto la composición, como la bioactividad de diversas especies vegetales tradicionalmente empleadas en plantas medicinales.

Dentro de este grupo de principios activos se encuentran a los compuestos fenólicos que son comúnmente hallados en las plantas, entre sus efectos positivos reportados en la literatura figuran el actuar como: antibacteriano (Ezoubeiri *et al.*, 2005), antimutagénico (Snijman *et al.*, 2007), entre otras.

Mediante el HPLC y otras pruebas, se ha determinado la presencia de estos compuestos fenólicos, en los extractos y aceites esenciales de *Matricaria chamomilla*, mas no se tienen referencias de esta determinación en las infusiones; análisis que se considera pertinente e importante, dado que, a los compuestos fenólicos se les atribuye propiedades antibacterianas y el análisis comparativo del perfil de compuestos fenólicos presentes en las infusiones y en el extracto de *Matricaria chamomilla*, podría tener una relación de causa-efecto de las propiedades antibacterianas de la *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia de la caries dental debido fundamentalmente a su amplia distribución por todo el mundo, y teniendo conocimiento que el *Streptococcus mutans* es considerado como el microorganismo más importante en la iniciación de la caries dental, se constituye como uno de los microorganismos cariogénicos más interesantes a estudiar en todos los aspectos. Sobre todo en aquellos que puedan estar relacionados con las estrategias de prevención y control dirigidas hacia la disminución o eliminación de esta bacteria en la cavidad oral porque aún esta bacteria no ha sido controlada en boca y uno de los agentes químicos más utilizados en su control posee efectos adversos.

La *Matricaria chamomilla*, ha demostrado tener propiedades antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans*, mediante sus aceites esenciales y extractos, sin embargo, las propiedades antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans* de la infusión no reúne muchas referencias. Por lo que, se está planteando el estudio del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de la *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans* para que pueda ser utilizada como enjuague bucal, considerando que la infusión de la *Matricaria chamomilla* es, por mucho, de fácil acceso, bajo costo, se encuentra al alcance de cualquier persona, no presenta efectos secundarios indeseables, además de que su elaboración es sencilla. Características que permitirían su utilización como enjuague bucal luego del cepillado dental en una mayor población y de esta forma ayudar en la prevención y disminución de la incidencia de la caries dental.

Además, se plantea determinar el perfil de compuestos fenólicos por HPLC del extracto hidroalcohólico y la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla*, ya que entre los efectos positivos a la salud relacionados a los compuestos fenólicos reportados en la literatura figuran el actuar como: antibacteriano (Ezoubeiri *et. al.*, 2005) y, por lo tanto, el investigar y conocer el perfil de compuestos fenólicos resulta importante porque puede ser empleada como indicador del efecto antibacteriano de la *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

1.3 PREGUNTAS DEL PROBLEMA

1.3.1 INTERROGANTE GENERAL

¿Las infusiones de MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) tendrán efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans*?

1.3.2 INTERROGANTES ESPECÍFICAS

- ¿Las infusiones al 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla* tendrán efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans*?
- ¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del colutorio de clorhexidina al 0,12 %?
- ¿Existirá diferencia en el efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans* de las infusiones al 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla* y del colutorio de clorhexidina al 0,12%?

- ¿Cuál será el perfil de compuestos fenólicos en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*?
- ¿Existirá diferencias en el perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro de la infusión de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.
- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del colutorio de clorhexidina al 0,12% sobre el *Streptococcus mutans*.
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans* de las infusiones 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla* y del colutorio de clorhexidina al 0,12%.
- Establecer el perfil de compuestos fenólicos de la infusión de *Matricaria chamomilla*.
- Establecer el perfil de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*.

- Comparar el perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*.

1.5 HIPÓTESIS

1.5.1 HIPÓTESIS GENERAL

H_i: La infusión de *Matricaria chamomilla* tiene efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans*.

1.5.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

H₁: Las infusiones al 2%, 4% y 8% de la *Matricaria chamomilla* tienen efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans*.

H₂: El efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans* de las infusiones al 2%, 4% y 8% de la *Matricaria chamomilla* del colutorio de clorhexidina al 0,12% es diferente.

H₃: El perfil cualitativo y cuantitativo de compuestos fenólicos en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de la *Matricaria chamomilla* es diferente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN

2.1.1 ANTECEDENTES LOCALES

No se reportan.

2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

No se reportan.

2.1.3 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Mirón, (1997), realizó el estudio efecto inhibitorio de la infusión de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*), in vitro. Utilizó la infusión a tres concentraciones (5%, 10% y 20%), que se obtuvieron de la siguiente manera: 20 gr. de las flores en 80

ml de agua destilada, se llevó a ebullición, sin dejar que perdieran agua por evaporación. Después de hervir 15 min se obtuvo 100 ml de solución madre al 20% y a partir de esta se realizaron las infusiones de 5% y 10%. Los resultados mostraron que la inhibición de ambos microorganismos, determinada a través del número de ufc/ml, fue evidente en la concentración al 10%, aunque al 20% también hubo efecto inhibitorio, este fue menor. Al 5% hubo inhibición (también menor que en la de 10%, pero mayor que al 20%) del *Lactobacillus acidophilus*. Para el *Streptococcus mutans* esta última concentración estimuló su crecimiento. Concluyeron que los componentes de la *Matricaria chamomilla* L. a diferentes concentraciones, no tiene el mismo efecto para cada uno de los microorganismos estudiados, la concentración al 10% fue la más efectiva al inhibir el crecimiento de ambos microorganismos, acercándose a lo que sería la concentración mínima inhibitoria ideal para su aplicación.

Modesto, Lima y Uzeda, (2003), el objetivo de su estudio fue evaluar y comparar el efecto antimicrobiano de soluciones utilizadas en la higiene bucal sobre la microbiota de los bebés. Las soluciones evaluadas fueron: solución salina como control, solución de bicarbonato de sodio a 10%, solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, solución obtenida de la infusión de *Matricaria chamomilla* al 4% y solución de fluoruro de sodio (NaF) al 0,02%. Todas las soluciones fueron diluidas con agua deionizada estéril hasta la dilución de 1/128. Después de la recolección de saliva no estimulada y de placa dental de 20 bebés, realizaron el test de difusión en agar. Los resultados mostraron que la solución salina, la solución de

bicarbonato de sodio y la solución obtenida de la infusión de *Matricaria chamomilla*, no presentaron efecto antibacteriano, independiente de su concentración y del origen del inóculo. Sólo las soluciones de H₂O₂ al 3% y la de NaF a 0,02% presentaron acción antimicrobiana significativa ($p < 0,01$) sobre la microbiota evaluada.

Sainz de Net y Ruiz, (2004), realizaron el estudio de la flora bacteriana en pacientes tratados ortodónticamente, aplicando enjuagues bucales de *Matricaria chamomilla* al 10%, el mismo que se obtuvo con 300 grs. de *Matricaria chamomilla*, en 3 ½ litros de agua, sometiéndolo a una temperatura de ebullición, hasta obtener una concentración de 3 litros, la misma que se distribuyó en dosis de 300 ml para dos enjuagues al día, por las mañanas y por las noches manteniéndolo 1 minuto en cavidad oral, durante 7 días. Sin que se realice ningún otro tipo de limpieza bucal. Se obtuvieron antes y después del uso de los enjuagatorios, muestras de placa dentobacteriana de 10 pacientes que recibían tratamiento ortodóntico. Concluyeron que los enjuagues de *Matricaria chamomilla*, ayudan a la no formación de la placa dentobacteriana que se forma alrededor de los brackets.

Alvear, (2007), realizó el estudio determinación in vitro de la actividad antibacteriana de soluciones empleadas para la higiene bucal del bebe. Utilizó como soluciones al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), al 3% y bicarbonato de sodio al 10%, las infusiones de manzanilla canela, orégano y matico al 8% cada una, dejándolas hervir durante 5 minutos, taparlas y

dejarlas enfriar durante 5 minutos, utilizadas, sin diluir, a dilución de ½, ¼ y 1/8 y solución salina utilizada como control. Después de la recolección de muestras de saliva de 20 recién nacidos, esta fue sembrada en medios de cultivo y se realizó el test de difusión en agar. Los resultados mostraron que las soluciones bicarbonato de sodio al 10%, las infusiones de manzanilla, canela, orégano, matico y la solución salina, no presentaron efecto antibacteriano, independiente de la concentración de la sustancia evaluada. Sólo la solución de H₂O₂ al 3% (sin diluir, al ½ y ¼) presentaron un efecto antibacteriano significativo sobre la microflora bucal (p<0,01).

Albuquerque *et. al.*, (2010), el objetivo de su estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto de la flor de *Matricaria recutita* Linn sobre los microorganismos del biofilm dental en comparación con la clorhexidina al 0,12%, mediante la concentración inhibitoria mínima. Utilizaron cepas bacterianas de *Streptococcus mitis* (ATCC9811), *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC10557), *Streptococcus sobrinus* (ATCC27609) y *Lactobacillus casei* (ATCC7469). Sus resultados mostraron que la *Matricaria recutita* Linn generó halos de inhibición con comprobada actividad antimicrobiana, los cuales variaron entre 12 y 15 mm para el extracto puro, mas estadísticamente no comparables a los halos de inhibición de la clorhexidina al 12%, donde se observó acción antimicrobiana hasta la dilución de 1:8 con los halos que variaron de 12 a 13 mm. Concluyeron que el extracto de *Matricaria recutita* Linn posee actividad antimicrobiana comprobada frente a los microorganismos ensayados, más su acción

antimicrobiana, para una determinada concentración del extracto, fue inferior a la acción de la clorhexidina al 0,12%.

Cárcamo, Oliva y Gonzales, (2011), el objetivo de su estudio fue determinar la efectividad antimicrobiana del colutorio en base a el extracto de *Matricaria recutita* l, tipo manzanilla primavera Puelche (0,8% de alcohol, 10% de glicerina y 0,8% de extracto de *Matricaria recutita* l.), en 32 pacientes. La aplicación del colutorio de manzanilla en 5 pacientes (grupo experimental), suero fisiológico en 6 pacientes (control negativo) y clorhexidina al 0,12% en 7 pacientes (control positivo). Se tomó muestras de la mucosa del carrillo y de superficie vestibular del primer molar superior, previo a la aplicación del colutorio y en 7 intervalos de tiempo. Bajo el microscopio electrónico se pudo evidenciar que el tipo de bacterias presentes en las placas de agar correspondió a *Streptococcus* y *Staphylococcus* Gram+. Se demostró que el recuento bacteriano, a través del número de unidades formadoras de colonias en las placas de agar, no presenta diferencias significativas en los tiempos analizados para mucosa y para diente, observándose que ningún resultado otorga un $p < 0,05$, en los 7 tiempos de aplicación. De esta manera concluyeron que la frecuencia de uso clínico del colutorio de manzanilla, presenta una mayor disminución de carga bacteriana cada 4 a 6 horas.

Rodríguez *et. al.*, (2013), el objetivo de su estudio fue determinar la acción antimicrobiana del enjuague de *Matricaria chamomilla* en pacientes tratados ortodónticamente. Se incluyeron a 10 pacientes con tratamiento de

ortodoncia, a 5 pacientes se les pidió que usaran un enjuague de *Matricaria chamomilla*, elaborado hirviendo 1.5 lts. de agua y agregando 100gr. de manzanilla, se dejaba a punto de ebullición hasta que se evaporara medio litro de agua y así obtener un concentrado de manzanilla al 10%, a 2 pacientes enjuague bucal Colgate Plax y 3 pacientes colutorio Oral B. Los resultados mostraron que todos los pacientes del grupo que usaron el enjuague bucal de *Matricaria chamomilla* presentaron una disminución de ufc/ml de hasta el 95% en comparación con los otros 2 grupos. El índice de placa y el índice de higiene oral fueron aceptables en todos los pacientes que usaron la manzanilla, no así en los demás pacientes.

Muñoz, *et. al.*, (2012), el objetivo de este estudio fue evaluar el contenido fenólico, la capacidad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de infusiones comerciales de hierbabuena (*Mentha piperita* L.), limón (*Cymbopogon citratos*), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), árnica (*Heterotheca inuloides*) y boldo (*Peumus boldus* Molina) de cuatro marcas diferentes. La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo por HPLC. En las infusiones evaluadas se identificaron diez diferentes compuestos, encontrándose en mayor concentración los compuestos catequina, epigallocatequina galato, ácido rosmarínico y eriocitrina. En la manzanilla, la concentración compuestos fenólicos totales y de flavonoides fue diferente en las cuatro marcas comerciales. En conclusión, sus resultados sugieren que las infusiones comerciales de boldo y hierbabuena muestran propiedades biológicas con beneficios potenciales a la salud.

2.2 MARCO REFERENCIAL

2.2.1 CARIES DENTAL

a. DEFINICIÓN

La caries dental, es definida como una enfermedad infecciosa, localizada, transmisible, post eruptiva y muy prevalente, de origen multifactorial, que termina con la destrucción de los tejidos duros del diente, cuando el proceso dinámico constante de desmineralización y remineralización en las piezas dentarias, es alterado por el exceso de producción de ácidos de los microorganismos cariogénicos, en combinación con sus factores de virulencia (Liébana, *et al.*, 2002).

Ecológicamente se estima que la caries dental es consecuencia de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una microbiota, antes considerada normal en la cavidad oral y ahora convertida en patógena (Liébana, *et al.*, 2002). La caries dental sin ser una enfermedad que comprometa la vida, constituye una de las patologías orales más frecuentes, con una duración de por vida.

b. FACTORES CAUSANTES DE CARIES DENTAL

Tenemos factores primarios y factores secundarios:

1) FACTORES PRIMARIOS. Se ha establecido cuatro factores denominados primarios: En 1960, Keyes estableció que la etiopatogenia de la caries dental obedece a tres factores principales: a) Microorganismos cariogénicos (microbiota), b) Substrato (dieta) y c) Factores propios del huésped (dientes). Estos factores primarios representan la clásica “Triada de Keyes”, a la que posteriormente, Newbrun, en 1978, le agregó un cuarto factor que es el tiempo, estableciendo así la “Triada de Keyes Modificada”, ya que si los tres primeros factores interactuaban por un período breve de tiempo, la caries dental no se produciría (Newbrun, 1991).

Para que se desarrolle caries, estos factores deben estar presentes e interactuar en condiciones óptimas; como un hospedero con tejidos susceptibles, colonizado por una microbiota con potencial cariogénico, consumiendo con frecuencia una dieta rica en sacarosa. A partir de estas condiciones se puede desarrollar la placa dental y después de algún tiempo se inicia la lesión de caries (Duque de Estrada, Pérez e Hidalgo, 2005).

Liébana, *et. al.*, (2002), ha señalado que de las más de 500 especies microbianas que existen en la cavidad oral, los microorganismos cariogénicos son las bacterias que se encuentran en la placa dental, a la que ha definido como una biopelícula formada por microorganismos adheridos entre sí y a una superficie dentaria, embebidos,

entremezclados y rodeados de un material extracelular abiótico de un triple origen: bacteriano, saliva y dieta.

a) MICROORGANISMOS CARIOGÉNICOS (MICROBIOTA). Las bacterias del género *Streptococcus* son las más importantes y prevalentes. En dicho género se encuentran los *Streptococcus viridans* (Liebana *et. al.*, 2002, Cabronero, 1991). Si bien los estudios experimentales en animales y observacionales en humanos, han demostrado que la habilidad de inducir caries dental no es una propiedad exclusiva de una especie en particular, han dejado claramente establecido que los *Streptococcus mutans* y los *Lactobacillus spp.* son las bacterias cariogénicas más agresivas (Marsh, 1999; Umar *et. al.*, 2005).

El *S. mutans* ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental y los *Lactobacillus spp* como las bacterias que prosperan en el medio carioso y contribuyen a la progresión de la enfermedad (Duque de Estrada, Pérez e Hidalgo, 2005).

b) SUBSTRATO (DIETA). Representado por una dieta que contenga sustancias fermentables por los microorganismos capaces de transformarlas en ácidos orgánicos, especialmente láctico, con la consecuente bajada de pH. Los azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa son las sustancias que con mayor facilidad son convertidas en ácidos y, de entre todas ellas la que

posee una mayor capacidad cariogénica es la sacarosa (Duque de Estrada, Pérez e Hidalgo, 2005; Baca, 2005)

- c) **FACTORES PROPIOS DEL HUESPED (DIENTE).** La anatomía e histología de los dientes influyen en la susceptibilidad a la caries. La caries de fosas y fisuras es debida en parte a la especial anatomía de la superficie oclusal, que presenta zonas de retención que favorecen la acumulación bacteriana e impiden la actuación de los mecanismos de limpieza (Duque de Estrada, Pérez e Hidalgo, 2005).
- d) **TIEMPO.** Los tres primeros necesitan encontrarse interaccionando de forma simultánea y adecuada para la ruptura del equilibrio que conduce a la desmineralización dental (Newbrun, 1991).

2.2.2 *Streptococcus mutans*

La primera información que se tiene sobre este microorganismo se remonta a 1924, cuando Clarke lo aisló de lesiones de caries en dientes humanos y le da el nombre de “mutans” debido a que el microorganismo aislado tenía tendencia a ser pleomórfico, presentándose bien como cadena de cocos, o como bacilos cortos en forma de mutantes (Clarke, 1924). Hoy se puede añadir que puede presentar formas variables en cuanto a la morfología de sus colonias (Figura 1).

a. **TAXONOMÍA** (Garrity, *et. al.*, 2007)

Dominio: Bacteria

Phylu: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

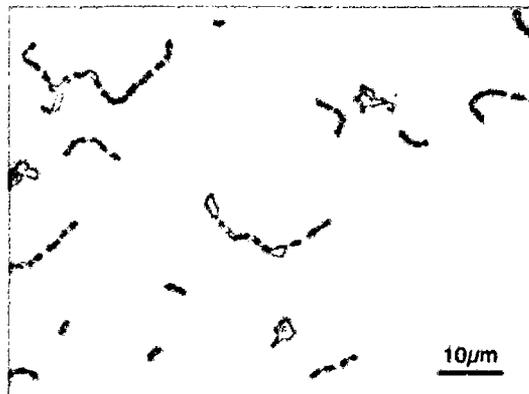
Familia: Streptococcaceae

Género: *Streptococcus*

Especie: *Streptococcus mutans*

FIGURA 1

Imagen microscópica de *Streptococcus mutans* ATCC®25175



b. **DESCRIPCIÓN**

Estos microorganismos poseen características comunes del género *Streptococcus* y son por tanto bacterias gram positivas, anaerobias, facultativas, que se asocian formando parejas o cadenas de cocos. Catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de

cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente 24 horas (Figura 2). Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco. Usualmente no producen ni hemólisis, ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas (Liébana *et. al.*, 2002; Gamboa, Herazo y Martínez, 2004).

FIGURA 2

Imagen de microscopio electrónico
de *Streptococcus mutans*



El *Streptococcus mutans* forma parte de la microbiota normal de la boca, y dentro de ella de la placa dental. Desde un punto de vista ecológico, el *Streptococcus mutans* ha desarrollado propiedades que le permiten colonizar selectivamente superficies duras tales como el esmalte dental y por lo tanto, requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización, es por esta razón que en el recién nacido es raro que se encuentre. Se hace patógeno al aumentar su proporción relativa en la boca

(Liebana *et al.*, 2002; Gamboa, Herazo y Martínez, 2004). En estado de salud bucal, un recuento de estas bacterias en boca será de $> 10^6$ ufc/ml (Umar *et al.*, 2005).

c. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El *Streptococcus mutans* además, es un agente infeccioso muy importante en la endocarditis bacteriana, el torrente sanguíneo puede ser invadido transitoriamente por esta bacteria tras un traumatismo u otros procesos, que incluirían las manipulaciones dentales o las cirugías del tracto respiratorio superior como las amigdalectomías (Ullman, *et al.*, 1988).

d. FACTORES DE VIRULENCIA (Hamada, Koga y Ooshima, 1984; Cabronero, 1991; Liébana *et al.*, 2002; Duque de Estrada, Pérez e Hidalgo, 2005)

Los factores de virulencia, son características específicas de cada microorganismo que le confieren su capacidad patógena. La mayoría de estos factores se relacionan con estrategias para producir ácidos (sobre todo láctico) y resistir las bajadas de pH consiguientes. Entre los factores de virulencia presentes en el *Streptococcus mutans* destacan:

- 1) **ACIDOGÉNESIS.** Rápida capacidad de alcanzar el pH crítico de desmineralización de 4.5-5.5.

- 2) **ACIDOFILIA.** Habilidad para sobrevivir a pH ácido.

- 3) **ACIDURICIDAD.** Capacidad de producir ácido en un medio con pH ácido, es decir, puede mantenerse metabólicamente activo a pesar de un pH bajo.

- 4) **PRODUCCIÓN DE AGUA OXIGENADA.** Ejercería un papel antagónico sobre microorganismos próximos; esta capacidad la posee sólo el *Streptococcus mutans*.

- 5) **EFFECTO POST pH CORTO.** Descensos rápidos de pH permiten su recuperación fisiológica rápida.

- 6) **PRODUCCIÓN DE MUTACINAS.** Se trata de sustancias de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana que pueden conferir una ventaja ecológica para la colonización y establecimiento en la placa dental.

- 7) **PRODUCCIÓN DE AGUA OXIGENADA.** Ejercería un papel antagónico sobre microorganismos próximos; esta capacidad la posee sólo el *Streptococcus mutans*.

- 8) **PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES.** La capacidad de producir sustancia mucoide o exopolisacáridos de naturaleza polisacárida, mediando la capacidad de adherencia bacteriana al esmalte dental.

9) SÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS INTRACELULARES. En presencia de sacarosa el *Streptococcus mutans* produce grandes cantidades de polisacáridos intracelulares, los cuales pueden ser metabolizados durante los periodos de tiempo en que no consumen carbohidratos.

10) METABOLISMO DE LA SACAROSA. El sustrato más importante para el *Streptococcus mutans* con respecto a su papel como agente etiológico de la caries, es la sacarosa, ya que no sólo es utilizado como fuente primaria de energía, sino que permite el inicio de reacciones bioquímicas adicionales responsables de su potencial cariogénico.

Klock y Krasse (1978), compararon diversos test de actividad de caries encontrando que sólo la frecuencia de caries y los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva, mostraban una correlación significativa con la actividad cariogénica, ilustrando así el valor del tratamiento antimicrobiano en esta bacteria.

2.2.3 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CARIES DENTAL

El objetivo de la prevención y control de la caries es la vigilancia de la placa dental, se enfoca en la remoción de la máxima cantidad posible de los depósitos acumulados sobre las superficies dentarias, por medio de métodos mecánicos y químicos realizados por el paciente o el profesional.

a. MÉTODOS MECÁNICOS Y QUÍMICOS EN EL CONTROL DE LA PLACA DENTAL

1) MÉTODOS MECÁNICOS. Comprenden la remoción de la placa por medio del cepillado, la limpieza interdental con hilo dental realizado por el paciente y el raspaje y alisado radicular con instrumentos manuales, instrumentos sónicos, ultrasónicos y rotatorios realizado por el profesional (Ocampo *et. al.*, 2000).

Estos métodos, no controlan la placa de forma efectiva, por diferentes motivos, al no eliminar en su totalidad la gran cantidad de bacterias presentes en el medio (Bernimoulin, 2003). Aun así, la higiene oral mecánica realizada de forma correcta no deja las superficies dentales completamente libres de placa, pero limita su acumulación e impide su maduración, haciéndola no patógena.

2) MÉTODOS QUÍMICOS. Utilizan sustancias antisépticas o antibióticas que permitan reducir o retardar la formación de la placa bacteriana, al interferir en la adherencia de las bacterias a la superficie dental, alterar el metabolismo bacteriano o evitar la proliferación bacteriana, eliminando la placa ya establecida o alterando su patogenicidad mediante enjuagues bucales y dentífricos (Marzal, 2012).

El enjuague bucal o colutorio bucal, es una solución que suele usarse después del cepillado de dientes, para eliminar las bacterias y microorganismos causantes de caries, eliminar el aliento desagradable y

mantener así la higiene bucal. Presenta la ventaja de que su actividad antimicrobiana puede alcanzar zonas de difícil acceso. El vehículo más comúnmente utilizado en los enjuagues es el agua y los principios activos son principalmente antisépticos, antibióticos, antifúngicos, astringentes y antiinflamatorios (Marzal, 2012).

Se ha comprobado estadísticamente que los pacientes que utilizan removedores de placa bacteriana, versus aquellos que sólo utilizan cepillado convencional, presentan un mejor control de la placa en un 75% (Grippaudo, 1995). Por ello, la idea de una sustancia capaz de eliminar fácilmente la placa bacteriana sin efectos secundarios ha sido y continúa siendo objeto de investigación (Marzal, 2012).

b. AGENTES QUÍMICOS EN EL CONTROL DE LA PLACA DENTAL

1) GENERALIDADES. Se considera que el *Streptococcus mutans* es sensible a varios agentes antibacterianos utilizados en enjuagues bucales, principalmente a la clorhexidina y triclosán. Estos se emplean preventivamente en el tratamiento de pacientes con alto número de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral, con el propósito de reducir su número y evitar la generación de caries (Bascones y Morante, 2008). No obstante los beneficios de la clorhexidina, se conoce que su uso prolongado o en exceso produce efectos adversos en el organismo y en la estética oral (Baca, Llodra y Junco, 1996).

2) CLORHEXIDINA

a) **DEFINICIÓN.** Es el “gold standard” de los enjuagues bucales que se usan en el control de la placa dental, dada su alta sustentividad. Es un detergente catiónico, de la clase de las bisbiguanidas, disponible en forma de acetato, hidrocloreto y digluconato, siendo este último el comúnmente utilizado en fórmulas y productos. Posee un amplio espectro de acción que está dada por la reducción de la formación de la película adquirida y la adhesión microbiana a la superficie dental (Bascones y Morantes, 2008; Mathur, *et. al.*, 2011).

b) **EFFECTOS COLATERALES DEL COLUTORIO DE CLORHEXIDINA AL 0,12%.** Su uso es limitado por sus efectos adversos, como tinciones dentarias. También altera la percepción del gusto hasta cuatro horas después del enjuague y, en algunos casos, su uso ha sido asociado a la aparición de cálculos supragingivales, descamaciones y úlceras en mucosa (Morante, 2003; Marzal, 2012).

c. **SUSTANCIAS NATURALES EN EL CONTROL DE PLACA BACTERIANA**

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, además del metabolismo primario presente en todos los seres

vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, son conocidos también como compuestos bioactivos, principios activos o productos naturales (Ávalos, Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que se sintetizan en pequeñas cantidades, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a una especie. Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Ávalos, Pérez-Urria, 2009). Troncoso *et. al.*, (2005) ha establecido que estos compuestos no son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto significativo en el curso de un rango de enfermedades.

En el ámbito odontológico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintas infusiones, extractos y aceites esenciales de plantas con el fin de ayudar en el control de la placa bacteriana y por consiguiente en la disminución de la prevalencia e incidencia de caries dental y enfermedad periodontal. Por lo tanto, el investigar y conocer el tipo de principio activo presente en las plantas resulta importante para poder encontrar la relación causa-efecto que ellos producen en la prevención o cura de enfermedades.

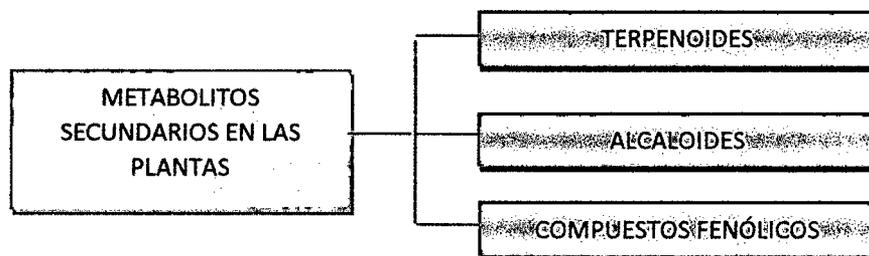
Los fármacos a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas, los principios activos están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse biológicamente entre sí, no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados (Cañigüeral, Dellacassa y Bandoni, 2003) y son accesibles a precios asequibles.

d. METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

Croteau, Kutchan y Lewis (2000), indican que los productos del metabolismo secundario pueden ser divididos en tres grupos, según su biosíntesis: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Figura 3).

FIGURA 3

Clasificación de los metabolitos secundarios en las plantas según su biosíntesis



Fuente: Croteau, Kutchan y Lewis (2000)

1) TERPENOIDES. También conocidos como isoprenoides y constituyen una clase de productos naturales de las plantas con mayor gama estructural y funcional. Se han aislado alrededor de 5500 terpenoides,

presentando funciones en el metabolismo primario y en el secundario, sin embargo, la mayoría de terpenoides son los productos de metabolismo secundario. (Croteau, Kutchan y Lewis (2000).

2) ALCALOIDES. Los alcaloides son productos naturales de bajo peso molecular. Los cerca de 12000 alcaloides conocidos presentan una o más moléculas de nitrógeno, siendo sintetizados principalmente a partir de aminoácidos (Croteau, Kutchan y Lewis (2000).

3) COMPUESTOS FENÓLICOS O POLIFENOLES

a) GENERALIDADES. Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional. En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico.

Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides, representan más de la mitad de los 8000 compuestos fenólicos identificados en la naturaleza (Ávalos, Pérez-Urria, 2009). Entre los efectos positivos a la salud relacionados a los compuestos fenólicos figuran el actuar como: antibacteriano (Ezoubeiri *et. al.*, 2005), antimutagénico (Snijman *et. al.*, 2007), entre otros.

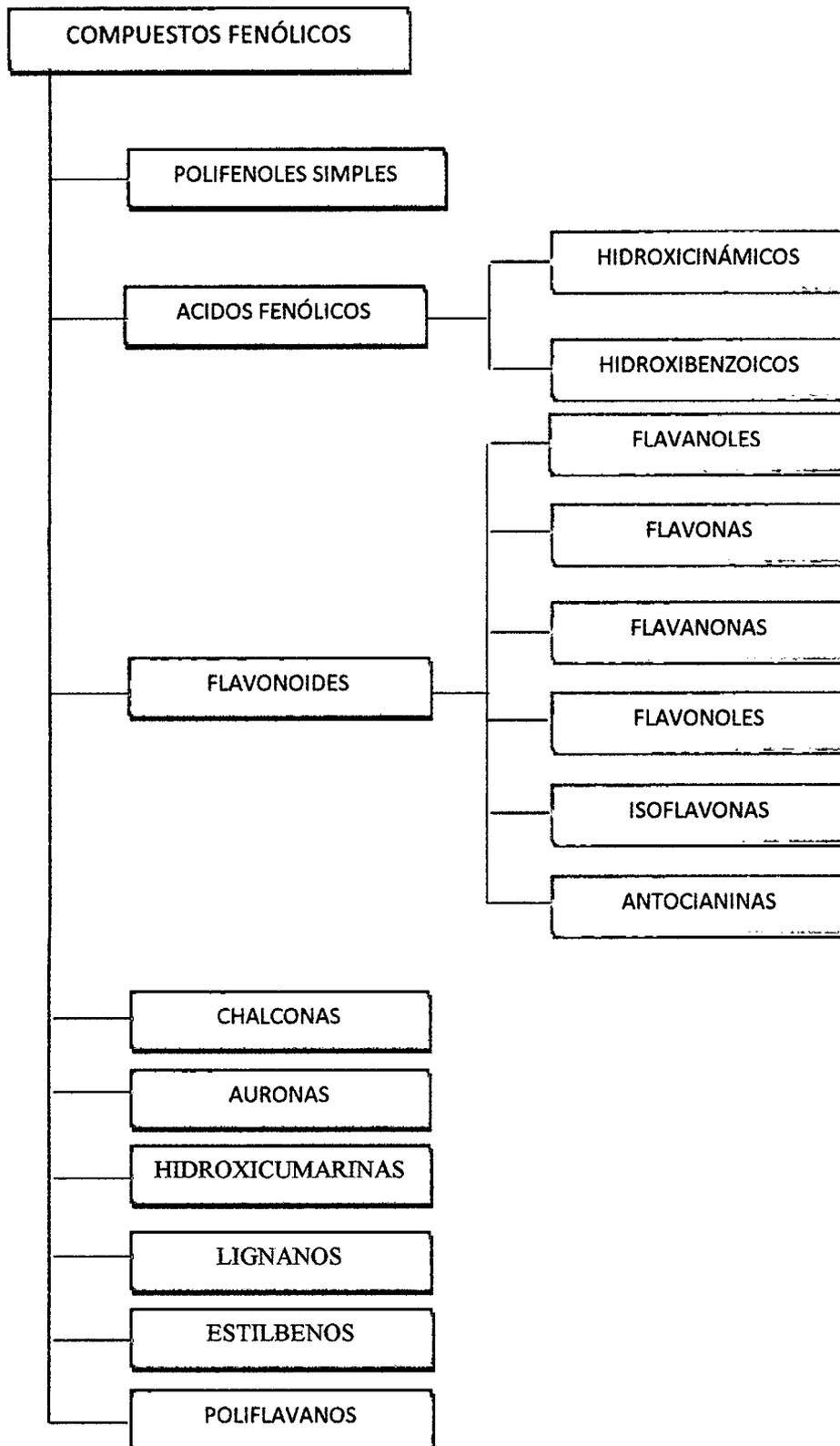
b) CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS. Los compuestos fenólicos son una amplia familia que incluye a diferentes subfamilias como: subfamilia de fenoles simples, subfamilia de ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), subfamilia de flavonoides (flavanoles, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas y antocianinas), subfamilia de chalconas, subfamilia de auronas (hispidol), subfamilia de hidroxicumarinas, subfamilia de lignanos, subfamilia de estilbenos, subfamilia de poliflavanos (proantocianidinas y prodeoxiantocianidinas) (Dicko *et. al.*, 2006). (Figura 4).

b.1) LOS ÁCIDOS FENÓLICOS. Constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos, distribuidos en la naturaleza y muestran un amplio espectro de actividades farmacológicas; estos han reportado propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antitumorales y anticarcinogénicas antimicrobianos (antisépticos y desinfectantes), antiinflamatorio, analgésico (Tarnawski *et. al.*, 2006). Se tiene a los ácidos hidroxibenzoicos y a las ácidos hidroxicinámicos.

○ **ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS.** Los más ampliamente distribuidos en frutas son: el *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Cabrita *et. al.*, 2007). Se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico dando origen a los ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico (Martínez-Valverde, Periago y Ross, 2000

FIGURA 4

Clasificación de los compuestos fenólicos



Fuente: Dicko *et. al.*, 2006

- **ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS.** Los más conocidos son: *p*-hydroxybenzoico, vanílico, siríngico y protocatéquico. Pueden estar presentes en forma soluble conjugada con azúcares o ácidos orgánicos o ligados en las fracciones de la pared celular.

b.2) LOS FLAVONOIDES. Las principales clases de flavonoides son flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (o catequinas), isoflavonas, flavanonoles, y antocianidinas, de los cuales las flavonas y flavonoles son los más extendidos (Tsao y Deng, 2004) Son antihemorrágicos, antiarrítmicos, protectores de la pared vascular, antiinflamatorios, antioxidantes, antihepatotóxicos, diuréticos, antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, antiespasmódicos (Martínez, 2005). A continuación se describen algunos de los flavonoides comúnmente hallados en los vegetales:

- **LOS FLAVONOLES.** Los flavonoles se acumulan en los tejidos exteriores aéreos (epidermis y hojas) porque su síntesis se ve estimulada por la luz. Los flavonoles más conocidos son la quercitina, el kaempferol y la mirecitina. La quercitina glicosidada predomina en la hoja de varios vegetales (Peterson y Dwyer, 1998).
- **LOS FLAVANOLES.** Pueden presentarse en forma monomérica (catequinas) y en forma polimérica (proantocianidinas o taninos condensados).

- **LAS FLAVONAS.** Las flavonas más comunes son la apigenina y luteolina. En vegetales y en las hojas de los vegetales, se ha reportado la presencia de los glicósidos de luteolina y apigenina.
- **LAS FLAVANONAS.** Las flavanonas contribuyen al sabor de los cítricos. Las principales flavanonas dietéticas son naringenina, erodictiol y hesperetinaa (Peterson y Dwyer, 1998).

e. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS

En la actualidad está en aumento la necesidad de cuantificar e identificar a los compuestos fenólicos presentes en la dieta, en diferentes plantas y entre las distintas variedades de la misma planta; debido a su importancia en la contribución al mantenimiento de la salud humana. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Tsao y Deng, 2004).

Las primeras técnicas desarrolladas para la cuantificación de compuestos fenólicos en plantas fueron las técnicas espectrofotométricas, sin embargo, no aportan la suficiente información para el completo análisis de la estructura absoluta y configuración de un compuesto fenólico, la que generalmente es una tarea complicada que requiere de la aplicación de

técnicas avanzadas y más precisas, que presenten alta sensibilidad y resolución como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), la cual se utiliza ampliamente tanto para la separación, identificación individualizada y cuantificación de compuestos fenólicos y que con la ayuda de la espectrometría de masas hace posible determinar diversos grupos estructurales presentes en los compuestos fenólicos (Martínez – Valverde, 2000; Tsao y Deng, 2004).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Aporta información para el completo análisis de la estructura absoluta y configuración de un compuesto fenólico. Está siendo ampliamente utilizada para la separación, identificación individualizada y cuantificación de compuestos fenólicos por su versatilidad, precisión, y costo relativamente bajo y que con la ayuda de la espectrometría de masas hace posible determinar diversos grupos estructurales presentes en los compuestos fenólicos (Tsao y Deng, 2004).

Con mayor frecuencia, el método que se emplea es la cromatografía de reparto en fase reversa, pues permite una considerable separación de las diferentes clases de compuestos fenólicos, pues está compuesta de una fase estacionaria la cual es no polar y una fase móvil la cual es relativamente polar.

2.2.4 *Matricaria chamomilla*

La manzanilla de Castilla, manzanilla alemana, dulce o cimarrona (*Matricaria recutita* o *Matricaria chamomilla*) es una planta herbácea anual de la familia de las asteráceas. Nativa de Europa y las regiones templadas de Asia, se ha naturalizado en algunas regiones de América y Australia (Figura 5).

a. SISTEMÁTICA DE LA *Matricaria chamomilla* (Conquist, 1981)

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

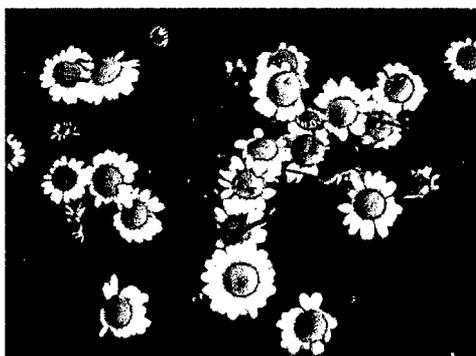
Familia: Astéraceae

Género: *Matricaria*

Especie: *Matricaria chamomilla*

FIGURA 5

Matricaria chamomilla



b. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es una planta autóctona de Europa y Asia Occidental. Hoy en día, se cultiva principalmente en Europa, América del Sur y, en menor medida, en África (Povh *et. al.*, 2001). Es una de las plantas medicinales más ampliamente utilizadas y está incluida en las farmacopeas de 26 países de todo el mundo. La farmacopea nacional Argentina, sostiene que la parte útil de la manzanilla está constituida por las inflorescencias desecadas de la *Matricaria chamomilla*, la que no debe contener más del 10% de las otras partes de la planta.

c. ESPECIES DE MANZANILLA (Mcneill *et. al.*, 2005)

Existen tres especies diferentes, denominadas genéricamente como manzanilla, todas ellas pertenecientes a la familia de las asteráceas y con similares virtudes:

- 1) *Matricaria chamomilla* o *Matricaria recutita* L. también llamada manzanilla alemana, manzanilla dulce o cimarrona o manzanilla común.
- 2) *Anthemis nobilis* o *Matricaria nobilis* o *Chamaemelum nobile* también llamada manzanilla romana, manzanilla amarga, manzanilla inglesa.
- 3) *Anthemis arvensis* también llamada manzanilla o camomila de campo o bastarda.

d. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Planta herbácea anual ramificada, alcanza desde los 30 hasta los 70cm de alto, de tallo cilíndrico liso brillante. Las hojas son de color verde intenso divididas en lóbulos dentados. Las flores se sitúan en el extremo de las ramas secundarias formando un capitulo floral y lígulas de color blanco que cuelgan a medida que maduran, el disco floral convexo tiene numerosas flores amarillas de corola tubular (Figura 6). De la manzanilla se utilizan las flores recogidas al principio de la floración (Mcneill *et. al.*, 2005).

FIGURA 6

Descripción botánica de la *Matricaria chamomilla*



e. PROPIEDADES

La *Matricaria chamomilla*, en particular, las cabezas de las flores secas de la planta, se utilizan ampliamente en la medicina tradicional debido a sus

propiedades antiinflamatorias, espasmolíticas, antipépticas, sedantes, antibacterianas y antifúngicas, las cuales se han relacionado con sus compuestos fenólicos. Sin embargo, los mecanismos implicados en las propiedades terapéuticas de esta planta todavía no se han dilucidado (Picada, *et. al.*, 2009).

Las principales formas de extraer las propiedades medicinales de las plantas son los aceites esenciales, los extractos y las infusiones. Las propiedades antibacterianas de la *Matricaria chamomilla*, sobre el *Streptococcus mutans*, han sido investigadas mediante extractos y aceites esenciales demostrándose su acción en el control de la placa dental (Sainz de Net y Ruiz, 2004; Albuquerque *et. al.*, 2010; Picada, *et. al.*, 2009; Rodríguez *et. al.* 2013), sin embargo, la infusión de *Matricaria chamomilla*, ha demostrado que tiene múltiples beneficios médicos bien conocidos, pero su posible uso como antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans* no reúne muchas referencias.

La infusión es una bebida que se obtiene de las partes aéreas (hojas secas, flores y frutos o que contengan sustancias activas volátiles) de varias hierbas o plantas aromáticas a las cuales se vierte agua a punto de hervir, se tapa y se deja reposar durante un tiempo (Anvisa, 2011). La *Matricaria chamomilla*, también es un factor protector para la conservación del flujo salival y para aumentar la capacidad buffer de la saliva, lo cual ayuda a que no se inicie la lesión cariosa y mejorar así la salud bucal de las personas (Larrucea *et. al.* 2013).

f. PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA *Matricaria chamomilla*

Se han identificado más de 120 componentes químicos en la flor de la *Matricaria chamomilla* como metabolitos secundarios, incluyendo 28 terpenoides, y 36 flavonoides (Pizard *et al.*, 2006). Contiene un gran grupo de clases de compuestos terapéuticamente interesantes y activos: sesquiterpénicas, flavonoides, cumarinas y poliacetilenos se consideran los componentes más importantes de la droga de manzanilla.

Las cumarinas se representan en la *Matricaria chamomilla* por herniarin, umbeliferona, y otros menores. Once compuestos fenólicos bioactivos (Gupta *et al.*, 2010), como herniarin y umbeliferona (cumarina), ácido clorogénico y el ácido cafeico (fenilpropanoides), apigenina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina y luteolina-7-O-glucósido (flavonas), quercetina y la rutina (flavonoles), y naringenina (flavanona) se encuentran en el extracto de manzanilla. El aceite esencial y los flavonoides serían los responsables prácticamente de todos los efectos farmacológicos conocidos.

2.2.5 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD IN VITRO A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS: SUSCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN.

Este método, que sufrió diferentes modificaciones fue estandarizado por Kirby - Bauer en los Estados Unidos, representa la prueba de

susceptibilidad antimicrobiana más utilizada en bacteriología clínica, porque permite obtener resultados bastantes exactos mediante un método estandarizado, sencillo, de ejecución rápida, económica y fácil de reproducir. Puede utilizarse como un método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo; este último es el más utilizado.

En esta técnica, el medio de cultivo se siembra con la cepa microbiana de ensayo o mediante vertido en placas sobre el medio de cultivo; en puntos adecuadamente distanciados entre sí, se colocan cantidades definidas del antibiótico a ensayar y del antibiótico estándar como patrón de comparación.

Para la aplicación de estos antibióticos se utilizan pequeños cilindros, pocillos o perforaciones practicadas en el medio de cultivo o discos con el antibiótico incorporado, si se utilizan discos, tan pronto como el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel filtro y el antibiótico difunde al medio que lo rodea.

Durante la incubación se produce alrededor de los puntos de aplicación unos halos de inhibición extensos de crecimiento microbiano y cuyo diámetro constituye una medida relativa de la actividad del antibiótico 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.

Cualitativamente, el halo de inhibición informa si el microorganismo es sensible, resistente o intermedio. La falta de desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es "S, sensible" al antimicrobiano selectivo, lo que significa 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 inferiores a "S" y superiores a "R" que es la que exige la dosis de antimicrobianos superiores a las habituales para obtener respuestas terapéutica favorable, siempre y cuando no produzca efectos secundarios.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

Nivel de investigación: Explicativo

Tipo de investigación: Experimental, prospectivo, transversal y analítico

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Experimental: Diseño de multigrupos aleatorios (Figura 7)

FIGURA 7

Diseño de multigrupos aleatorios

GE_1	X_1	O_1
GE_2	X_2	O_2
GE_3	X_3	O_3
$GC+$	X_4	O_4
$GC-$	X_5	O_5

GE : grupo experimental

X_i : manipulación del grupo experimental (aplicación del estímulo)

O_i : observación de la variable respuesta

GC+ : grupo control positivo

GC- : grupo control negativo

3.3 GRUPOS DE ESTUDIO

3.3.1 PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LAS INFUSIONES AL 2%, 4% y 8% DE *Matricaria chamomilla*

a. GRUPOS EXPERIMENTALES (GE)

GE₁ : Infusión de MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) al 2%

GE₂ : Infusión de MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) al 4%

GE₃ : Infusión de MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) al 8%

b. GRUPO CONTROL POSITIVO (GCP)

GC+ : Colutorio de clorhexidina al 0,12 %

c. GRUPO CONTROL NEGATIVO (GCN)

GC- : Agua mineral esterilizada

3.3.2 PARA DETERMINAR EL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA INFUSIÓN AL 2% y EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla*

a. GRUPO DE ESTUDIO (GE)

GE : Infusión de *Matricaria chamomilla* al 2%

b. GRUPO COMPARATIVO (GC)

GC : Extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*

3.4 VARIABLES

3.4.1 EN EL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO LAS INFUSIONES AL 2%, 4% y 8% DE *Matricaria chamomilla*

a. VARIABLE INDEPENDIENTE: Infusiones de *Matricaria chamomilla*

INDICADORES:

- Infusión de *Matricaria chamomilla* al 2%
1 gr de inflorescencias de *Matricaria chamomilla* en 50 ml de agua mineral esterilizada.
- Infusión de *Matricaria chamomilla* al 4%
2 gr de inflorescencias de *Matricaria chamomilla* en 50 ml de agua mineral esterilizada.
- Infusión de *Matricaria chamomilla* al 8%
4 gr de inflorescencias de *Matricaria chamomilla* en 50 ml de agua mineral esterilizada.

b. VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans*

INDICADOR: Halos de inhibición (mm)

3.4.2 EN EL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA INFUSIÓN AL 2% y EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla*

VARIABLE ÚNICA: Perfil de compuestos fenólicos.

3.5 TRATAMIENTOS Y REPETICIONES PARA EL ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE infusión de *Matricaria chamomilla* SOBRE EL *Streptococcus mutans*.

Se evaluó el efecto antibacteriano de la infusión de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*, en tres concentraciones (2%, 4% y 8%). Se tuvo un control positivo C+: clorhexidina al 0,12% y un control negativo C- : agua mineral esterilizada (Cuadro 1).

CUADRO 1

Tratamientos, productos y concentración en estudio para el análisis del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

TRATAMIENTOS	PRODUCTO Y CONCENTRACIÓN
T1	Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 2%
T2	Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 4%
T3	Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 8%
T4	Colutorio de Clorhexidina al 0,12%
T5	Agua mineral esterilizada

Fuente: Elaboración propia

Se realizó tres repeticiones de cada tratamiento, sumando un total de 15 unidades experimentales (Cuadro 2).

CUADRO 2

Tratamientos, repeticiones y unidades experimentales para el análisis del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

REPETICIONES	TRATAMIENTOS				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	T1R1	T2R1	T3R1	T4R1	T5R1
R2	T1R2	T2R2	T3R2	T4R2	T5R2
R3	T1R3	T2R3	T3R3	T4R3	T5R3

Fuente: Elaboración propia

3.6 DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

- La inflorescencias de *Matricaria chamomilla* fueron proporcionadas por los productores del centro poblado de Jallihuaya distrito de Puno, provincia de Puno, departamento de Puno – Perú.
- Se realizó la prueba piloto para la desecación natural de las inflorescencias de *Matricaria chamomilla* y la preparación de las concentraciones de las infusiones en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano (Anexo 1).

3.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LA *Matricaria chamomilla* SOBRE EL *Streptococcus mutans*

3.7.1 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE BOTÁNICA

Para la correcta identificación y caracterización botánica, el material vegetal fue enviado al Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Agraria la Molina (UNALM) -Lima (Anexo 2).

3.7.2 RECOLECCIÓN, SELECCIÓN, LIMPIEZA Y DESECACIÓN DE LA INFLORESCENCIAS de *Matricaria chamomilla*

a. RECOLECCIÓN

Se procedió a la recolección manual cuando la flor estaba en plena apertura, dejando sólo 1 cm de tallo, obteniendo una muestra representativa que se transportó en bolsas de papel rotuladas correctamente, con el nombre de la planta, fecha y lugar de recolección.

b. SELECCIÓN Y LIMPIEZA

Sólo se consideraron las inflorescencias de la *Matricaria chamomilla* que presentaron las mejores condiciones para la investigación, de tal modo que no presentaran daños físicos ni microbiológicos. Se eliminaron los restos de materias extrañas, tierra, entre otros, en forma manual (Figura 8).

FIGURA 8

INFLORESCENCIAS DE *Matricaria*
chamomilla SELECCIONADAS

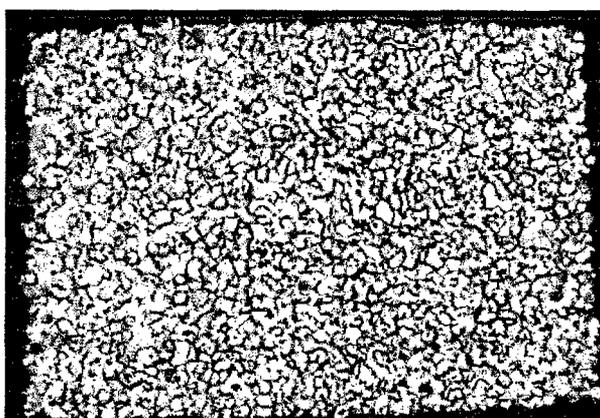


c. DESECACIÓN DE LAS INFLORESCENCIAS

Las inflorescencias se deshidrataron a una temperatura aproximada de 20°C, por 17 días, sobre cajas de cartón cubiertas con papel periódico sin impresión. Una vez que se obtuvo el material vegetal completamente seco, se procedió a guardarlo en cajitas de cartón correctamente etiquetadas, con su nombre científico, fecha, lugar de recolección y peso (Figura 9).

FIGURA 9

DESECACIÓN DE LAS INFLORESCENCIAS



3.7.3 PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DEL TEST DE DIFUSIÓN POR DISCO

Las inflorescencias fueron transportadas al laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM – Lima, para la preparación de las infusiones y realizar el test de difusión. (Anexo 3).

a. REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *Streptococcus mutans* ATCC®25175

Según lo indicado en el envase se procedió a extraer el hisopo que se encontraba en el contenedor de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC®25175, se realizó la siembra en una placa de Agar Muller Hinton (MHA) y se incubó a 35°C por 24 horas. De esta cepa reactivada se inoculó una asada en caldo nutritivo por un periodo de 24 horas a 28°C en movimiento constante. Certificado de la cepa ATCC®25175 (Anexo 4).

b. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Del cultivo de *Streptococcus mutans* de 24 horas se extrajo una alícuota de 1000 uL y se procedió a medir al espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. A partir de este se realizó una dilución en caldo nutritivo hasta alcanzar los 0.5 McFarland. De esta dilución se agregó 100 uL a cada placa y se extendió con un asa de digralsky, luego, se dejó secar por aproximadamente 15 minutos.

c. PREPARACIÓN DE LAS INFUSIONES DE *Matricaria chamomilla*

Para la infusión se pesó 4 g de inflorescencias de manzanilla y se le agregó 50 mL de agua mineral esterilizada a 100°C (infusión 8%) se puso en reposo durante 5 minutos y se procedió a filtrar. El líquido obtenido fue esterilizado por filtración en un embudo con papel filtro estéril de 22 μ m de poro, a partir de ella se realizaron las infusiones de 4% y 2% con la misma agua mineral que se usó para el control negativo (Figura 10).

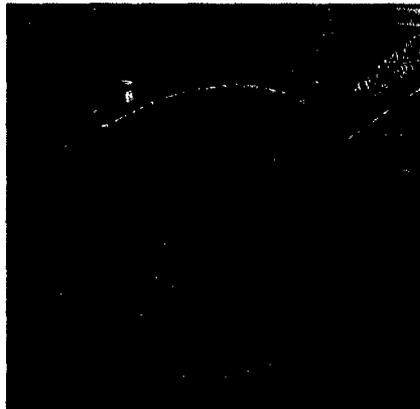
FIGURA 10
PREPARACIÓN DE LAS
INFUSIONES



d. COLOCACIÓN DE DISCOS DE ANTIMICROBIANO

Se sumergieron 5 discos de 5 mm de diámetro y 0.02 mm de espesor en cada una de las infusiones (8%, 4% y 2%) y en los controles positivo, clorhexidina al 0,12% (C+) y negativo, agua mineral esterilizada (C-) se dejó en incubación a 35°C por 24 horas (Figura 11). Se procedió a medir los halos con una regla de metal INCH Stanless de 20cm.

FIGURA 11
COLOCACIÓN DE DISCOS
CON ANTIMICROBIANO



e. MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Después de retirar la placa de la incubadora, se examinó detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano. Observándose la presencia de halos de inhibición de 2.5 mm en promedio en el disco que tenía colutorio de clorhexidina al 0,12% (Figuras 12, 13, 14)

FIGURA 12

Repetición 1 de 5 tratamientos

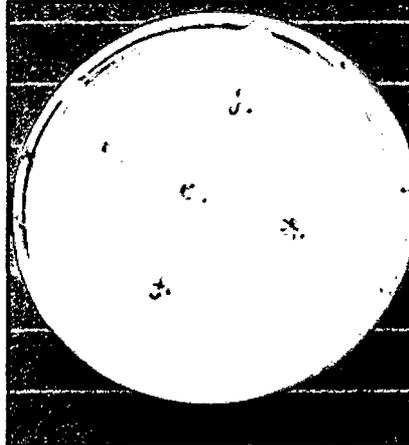


FIGURA 13

Repetición 2 de 5 tratamientos



FIGURA 14

Repetición 3 de 5 tratamientos



3.8 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA INFUSION AL 2% Y DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla* POR HPLC

Llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología - área de Biotecnología Industrial de la UNALM. (Anexo 5). Para la extracción de compuestos fenólicos por el método HPLC fue tomado de Rosana Chirinos *et. al.*, (2011), donde se definieron los parámetros de extracción de los compuestos fenólicos de *la Matricaria chamomilla*.

El perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos presentes en las fracciones obtenidas para la infusión al 2% y el extracto hidroalcoholido de *Matricaria chamomilla* fueron determinadas a 280, 320 y 360 nm debido a que la mayor parte de los compuestos fenólicos detectados presentaron máximas absorbancias a esas longitudes de onda. Los análisis cromatograficos se realizaron por triplicado.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Se determinó el promedio aritmético del halo de inhibición de la clorhexidina (C+); no se utilizó el diseño completamente al azar (DCA) para la prueba de control in vitro, con cinco tratamientos y tres repeticiones por cada tratamiento. Cuyo modelo matemático lineal es:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Dado que no se observó halos de inhibición en los demás tratamiento.

- Se determinó el contenido de los compuestos fenólicos totales, de los ácidos fenólicos y de los flavonoides presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*.
- Se utilizaron gráficos para comparar los mg/g muestra de los compuestos fenólicos presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*.
- Se utilizó la prueba estadística t de student ($\alpha=0,01$) para comparar el perfil de compuestos fenólicos presentes en la infusión al 2% y en extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* y poner a prueba las hipótesis, determinando diferencias estadísticamente significativas o no.

3.10 ÁMBITO DE ESTUDIO

3.10.1 ÁMBITO GENERAL

PUNO. Es un departamento del Perú situado en el sureste del país. Ocupa 67 mil km² de territorio conformado por la mitad occidental de la Meseta del Collao. Limita al este con territorio boliviano, al suroeste con los departamentos de Tacna, Moquegua y Arequipa, al oeste con el del Cuzco y al norte con Madre de Dios.

LIMA: Lima es una provincia del Perú ubicada en la costa central del país. Linda al noroeste y al suroeste con el océano Pacífico y limita con la provincia de Huaral al norte, con las provincias de Canta, Huarochirí al

este, con la provincia de Cañete al sur y con la Provincia Constitucional del Callao al oeste.

3.10.2 ÁMBITO ESPECÍFICO

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO (UNA). Es una de las primeras universidades públicas fundadas en 1856 a iniciativa de la población del departamento de Puno. Inicialmente fue creada como escuela de formación aristocrática. Está ubicada en la provincia de Puno, ciudad de Puno, Perú. Destaca en: Ciencias, Tecnologías y Artes aplicadas. La UNA está organizada en 19 facultades que abarcan 37 escuelas profesionales.

LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS (UNA). Pertenece a la Escuela Profesional de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA. Desarrolla actividades de docencia, investigación de pregrado y postgrado. Presta servicios de diagnóstico bacteriológico para muestras clínicas mediante aislamiento tradicional y estudio de susceptibilidad a antimicrobianos. También se realizan cultivos de patógenos de crecimiento lento o difícil.

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA (UNALM). Es una universidad pública ubicada en la ciudad de Lima, Perú. Fue fundada el 22 de julio de 1902. Es una de las universidades más importantes del país. La Universidad cuenta con 8 facultades, 12 escuelas profesionales

y, 1 Escuela Universitaria de Postgrado, especializadas en el ámbito de las ciencias naturales, agrarias y medio ambientales.

HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (UNALM). Pertenece al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNALM. La Facultad de Ciencias tiene como objetivo-enseñanza: Formar biólogos en las orientaciones de Ecología y Biotecnología en Investigación: Trabajar en las áreas de biología de genes, especies, ecosistemas y biotecnología Proyección Social: Proyectar la investigación a la comunidad mediante capacitación, convenios y transferencias de tecnologías.

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO" DE LA FACULTAD DE CIENCIAS LA UNALM. Pertenece al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNALM. Se encuentra ubicado en la parte posterior del Vicerectorado Administrativo, frente al CEPDA. El laboratorio tiene 32 años de funcionamiento ininterrumpido. Actualmente la Directora del Laboratorio es la Dra. Doris Zúñiga Dávila.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (IBT) – (UNALM). El Instituto de Biotecnología de UNALM está a la vanguardia de la investigación a nivel nacional y es un referente para el desarrollo productivo del país. El IBT inició sus actividades en 1998, con la participación de docentes de las Facultades de Agronomía, Ciencias, Ciencias Forestales, Industrias Alimentarias y Zootecnia.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

a. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LAS INFUSIONES AL 2%, 4%, 8% DE LA *Matricaria chamomilla*, SOBRE EL *Streptococcus mutans*.

CUADRO 3

Efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla*, del colutorio de clorhexidina al 0,12% y del agua mineral esterilizada sobre el *Streptococcus mutans*, 2014.

REPETICIONES	HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS (mm)				
	T1 Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 2%	T2 Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 4%	T3 Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> al 8%	T4 Colutorio de clorhexidina al 0,12% (C+)	T5 Agua mineral esterilizada (C-)
R1	0	0	0	2.5	0
R2	0	0	0	2.5	0
R3	0	0	0	2.4	0

Fuente: Matriz de datos

INTERPRETACIÓN

No se evidencia halos de inhibición en las infusiones de *Matricaria chamomilla* al 2%, 4% y 8%, si se evidencia halos de inhibición de 2.5 mm en promedio en el colutorio de clorhexidina al 0,12% (C+).

b. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA INFUSIÓN AL 2% DE *Matricaria chamomilla*

En la Figura 15 se muestran los cromatogramas de la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* a 280 nm, 320 nm y 360 nm. Se detectaron un total de 29 picos, los cuales presentaron tiempos de retención entre los 25.44 y 90.25 minutos. La infusión presentó una variedad de compuestos fenólicos, tales como: ácidos fenólicos (ácidos cinámicos); flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavonas) como se muestra en el cuadro 4.

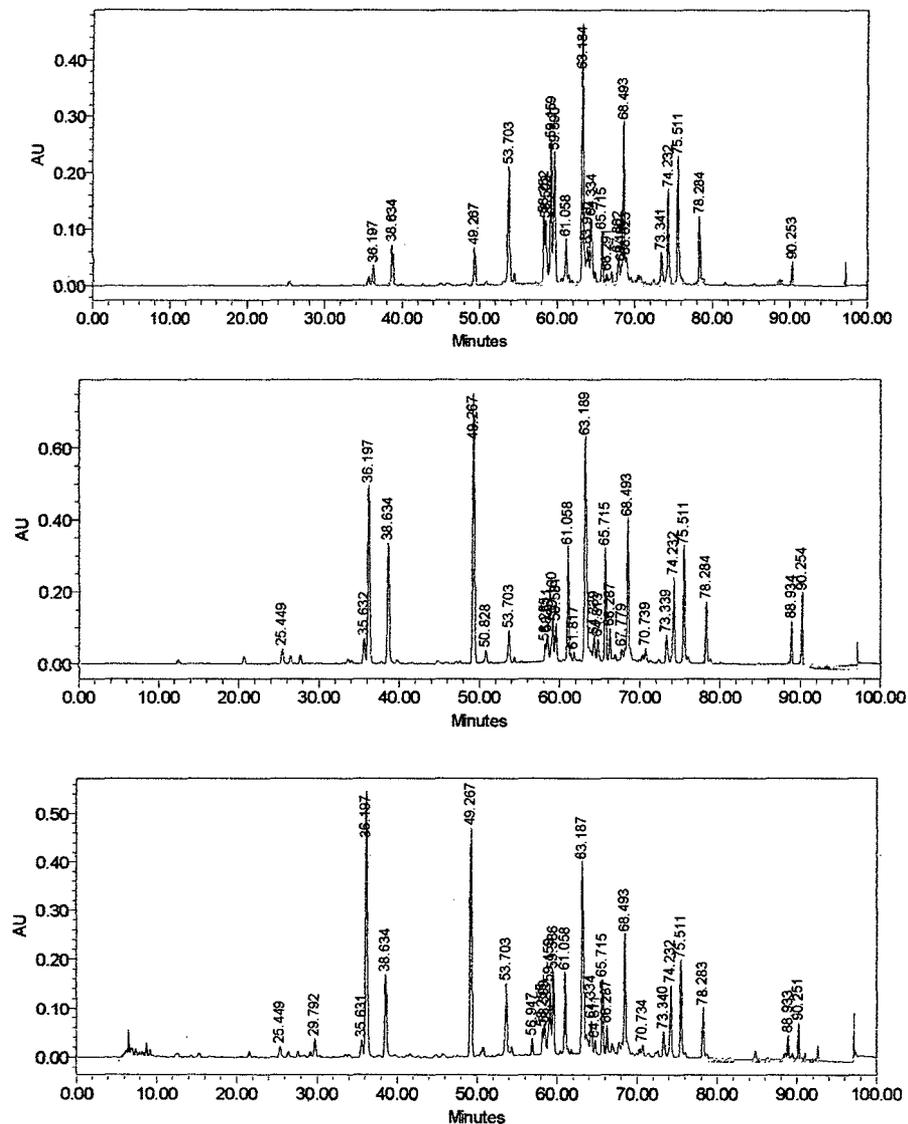
Los picos detectados mostraron características espectrales similares a la de los ácidos cinámicos del tipo ácido cafeico (picos 1, 3, 4, 6, 7, 14, 15, 18, 19, 20 y 23) y p-cumárico (picos 28 y 29); flavanoles del tipo catequina (picos 2 y 9); flavonoles del tipo quercitina (picos 8, 10, 12, 13, 17 y 21), flavonas del tipo luteolina (pico 11) y del tipo apigenina (picos 16, 22, 24, 25, 26 y 27), debido a la similitud de las características espectrales con los respectivos estándares.

La cantidad total de ácidos cinámicos, flavonoles, flavanoles y flavonas para la infusión de *Matricaria chamomilla* fueron: 9.87, 4.98, 1.59 y 10.51 mg/g muestra, respectivamente; haciendo un total de 26.95 mg/g muestra de

compuestos fenólicos. El pico más representativo para la infusión de *Matricaria chamomilla* al 2% fue el pico 16 (derivado de flavona: apigenina).

FIGURA 15

Perfil cromatográfico HPLC de la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* a la longitud de onda de 280 nm, 320 nm y 360 nm, 2014.



Fuente: Informe de resultado de análisis de perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto *Matricaria chamomilla* por HPLC del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

CUADRO 4

Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla*, 2014.

	Tiempo de retención (min)	L.O.**	Concentración (mg/g muestra)	Compuesto fenólico asignado
1	25.44	320 nm	0.12	Derivado de ácido cinámico ^a
2	29.79	280 nm	0.94	Derivado de flavanol ^b
3	35.63	320 nm	0.20	Derivado de ácido cinámico ^a
4	36.19	320 nm	1.55	Derivado de ácido cinámico ^a
5	38.63	320 nm	3.06	Clorogénico
6	49.26	320 nm	2.21	Derivado de ácido cinámico ^a
7	50.82	320 nm	0.08	Derivado de ácido cinámico ^a
8	53.70	360 nm	1.07	Derivado de flavanol ^c
9	56.94	280 nm	0.65	Derivado de flavanol ^b
10	58.25	360 nm	0.54	Derivado de flavanol ^c
11	58.51	320 nm	0.50	Derivado de flavona ^d
12	59.15	360 nm	1.27	Derivado de flavanol ^c
13	59.59	360 nm	1.26	Derivado de flavanol ^c
14	61.05	320 nm	0.68	Derivado de ácido cinámico ^a
15	61.81	320 nm	0.05	Derivado de ácido cinámico ^a
16	63.18	320 nm	4.19	Derivado de flavona ^e
17	64.33	360 nm	0.61	Derivado de flavanol ^c
18	64.81	320 nm	0.13	Derivado de ácido cinámico ^a
19	65.71	320 nm	0.74	Derivado de ácido cinámico ^a
20	66.28	320 nm	0.19	Derivado de ácido cinámico ^a
21	67.80	360 nm	0.23	Derivado de flavanol ^b
22	68.49	320 nm	1.71	Derivado de flavona ^e
23	70.73	320 nm	0.09	Derivado de ácido cinámico ^a
24	73.33	320 nm	0.45	Derivado de flavona ^e
25	74.23	320 nm	1.17	Derivado de flavona ^e
26	75.51	320 nm	1.64	Derivado de flavona ^e
27	78.28	320 nm	0.85	Derivado de flavona ^e
28	88.93	320 nm	0.29	Derivado de ácido cinámico ^f
29	90.25	320 nm	0.48	Derivado de ácido cinámico ^f
Total			26.95	

*Promedio de tres repeticiones

aCuantificado como cafeico a 320 nm, bCuantificado como catequina a 280 nm, ccuantificado como quercitina a 360 nm, dCuantificado como luteolina a 320 nm, eCuantificado como Apigenina a 320nm, fCuantificado como p-cumárico a 320 nm.

**Longitud de onda de cuantificación

Fuente: Informe de resultado de análisis de perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto *Matricaria chamomilla* por HPLC del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

c. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla*

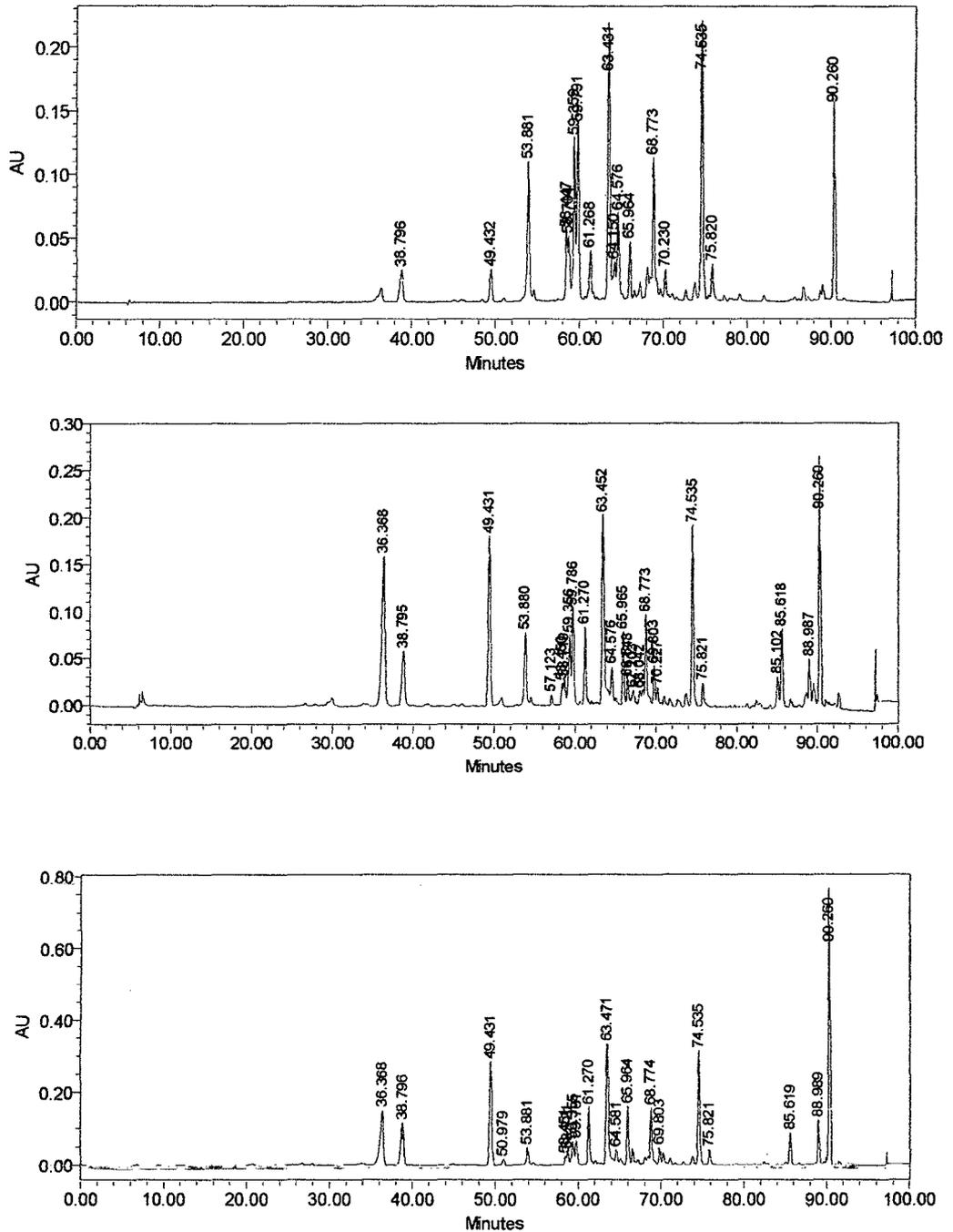
En la Figura 16 se muestran los cromatogramas del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* a 280 nm, 320 nm y 360 nm. Fueron detectados un total de 25 picos, los cuales presentaron tiempos de retención entre los 36,368 y 90,260 minutos. El extracto hidroalcohólico presentó una variedad de compuestos fenólicos, tales como: ácidos fenólicos (ácidos cinámicos) y flavonoides (flavanol, flavonoles, flavonas y flavanona) como se muestra en el cuadro 5.

Los picos detectados mostraron características espectrales similares a la de los ácidos fenólicos cinámicos del tipo ácido cafeico (picos 1, 3, 4, 11, y 15) y p-cumárico (picos 18, 23, 24 y 25) y ácido clorogénico (pico 2); flavonoides como flavanol del tipo catequina (pico 6), flavonoles del tipo quercitina (picos 5, 7, 9, 10, 13 y 14); flavonas del tipo luteolina (pico 8 y 16), del tipo apigenina (picos 12, 17, 19, 20 y 21); flavanona del tipo eridictiol (pico 22), debido a la similitud de las características espectrales con los respectivos estándares.

La cantidad total de ácidos cinámicos, flavanol, flavonoles, flavonas y flavanona para el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* fueron: 15.79, 0.52, 6.84, 13.21 y 1.15 mg/g muestra, respectivamente; haciendo un total de 37.51 mg/g muestra de compuestos fenólicos. El pico más representativo para esta fracción de la *Matricaria chamomilla* fue el pico 25 (derivado de ácido cinámico: p-cumárico).

FIGURA 16

Perfil cromatográfico HPLC del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* a la longitud de onda de 280 nm 320 nm y 360 nm, 2014.



Fuente: Informe de resultado de análisis de perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto *Matricaria Chamomilla* por HPLC del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

CUADRO 5

Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, 2014.

	Tiempo de retención (min)	L.O.**	Concentración (mg/g muestra)	Compuesto fenólico asignado
1	36.368	320 nm	1.68	Derivado de ácido cinámico ^a
2	38.796	320 nm	1.20	Ácido clorogénico
3	49.431	320 nm	2.32	Derivado de ácido cinámico ^a
4	50.979	320 nm	0.07	Derivado de ácido cinámico ^a
5	53.881	360 nm	1.39	Derivado de flavonol ^c
6	57.123	280 nm	0.52	Derivado de flavanol ^b
7	58.447	360 nm	0.60	Derivado de flavonol ^c
8	58.721	320 nm	0.60	Derivado de flavona ^d
9	59.359	360 nm	1.64	Derivado de flavonol ^c
10	59.791	360 nm	1.87	Derivado de flavonol ^c
11	61.270	320 nm	0.97	Derivado de ácido cinámico ^a
12	63.471	320 nm	5.65	Derivado de flavona ^e
13	64.150	360 nm	0.44	Derivado de flavonol ^c
14	64.576	360 nm	0.90	Derivado de flavonol ^c
15	65.964	320 nm	0.99	Derivado de ácido cinámico ^a
16	68.042	320 nm	0.20	Derivado de flavona ^d
17	68.774	320 nm	1.84	Derivado de flavona ^e
18	69.803	320 nm	0.37	Derivado de ácido cinámico ^f
19	70.227	320 nm	0.21	Derivado de flavona ^e
20	74.535	320 nm	4.22	Derivado de flavona ^e
21	75.821	320 nm	0.49	Derivado de flavona ^e
22	85.102	280 nm	1.15	Derivado de flavanona ^g
23	85.619	320 nm	0.83	Derivado de ácido cinámico ^f
24	88.989	320 nm	0.95	Derivado de ácido cinámico ^f
25	90.260	320 nm	6.42	Derivado de ácido cinámico ^f
TOTAL			37.51	

*Promedio de tres repeticiones

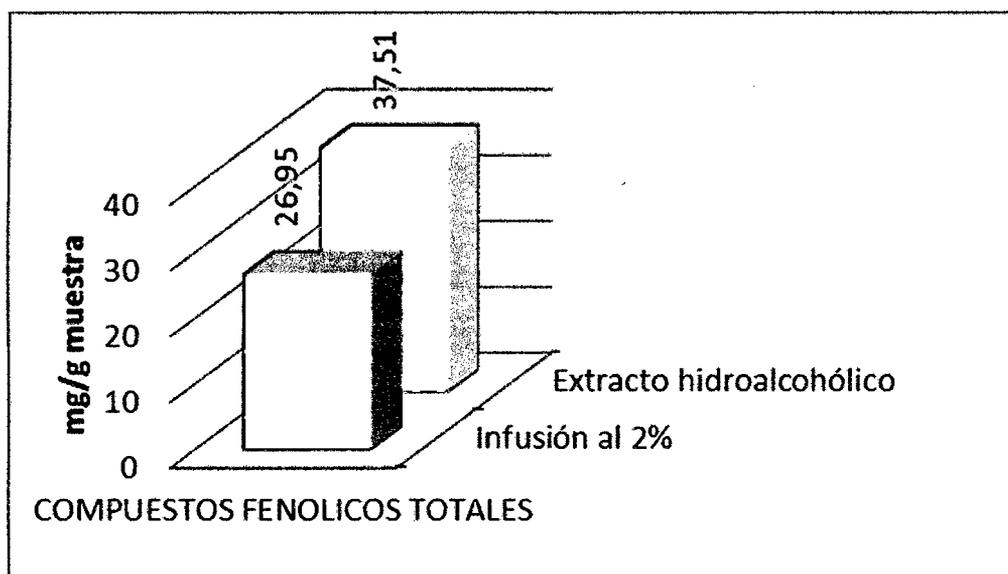
^aCuantificado como cafeico a 320 nm, ^bCuantificado como catequina a 280 nm, ^ccuantificado como quercitina a 360 nm, ^dCuantificado como luteolina a 320 nm, ^eCuantificado como Apigenina a 320nm, ^fCuantificado como p-cumárico a 320 nm, ^gCuantificado como eriodictiol.

**Longitud de onda de cuantificación

Fuente: Informe de resultado de análisis de perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto *Matricaria Chamomilla* por HPLC del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

FIGURA 17

CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN mg/g MUESTRA EN LA INFUSIÓN AL 2% Y EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla* DETECTADOS POR HPLC, 2014.

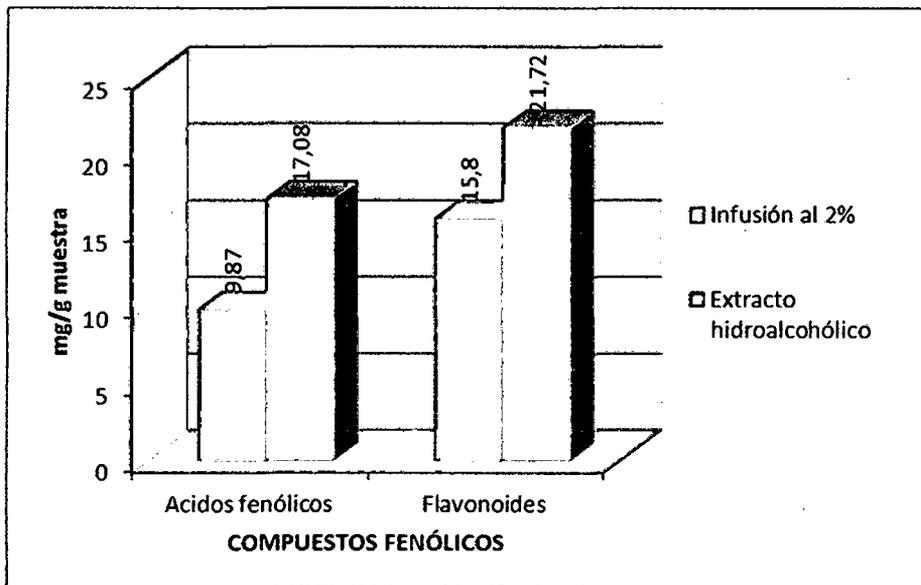


INTERPRETACIÓN

Se observó que el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, presentó mayor concentración de compuestos fenólicos totales que la infusión al 2% (37,51 y 26,95 mg/g muestra). Sin embargo, no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los compuestos fenólicos totales presentes en la infusión y en el extracto ($t = 1,258$; $p = 0.133$).

FIGURA 18

CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS: ÁCIDOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES EN mg/g MUESTRA EN LA INFUSIÓN AL 2% Y EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla* DETECTADOS POR HPLC, 2014.

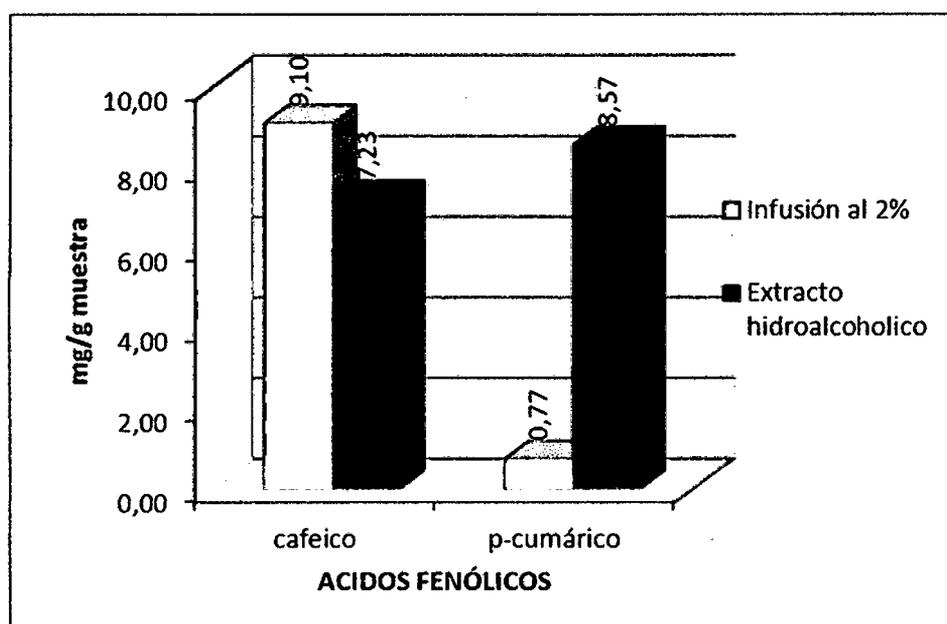


INTERPRETACIÓN

El extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, presenta mayor concentración de ácidos fenólicos y flavonoides (17.08 y 21.72 mg/g muestra respectivamente) que la infusión al 2%. Sin embargo, no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los ácidos fenólicos ($t = 1,553$; $p = 0.135$) y entre los flavonoides ($t = 0,65$; $p = 0.515$) presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

FIGURA 19

CONCENTRACIÓN DE ACIDOS FENÓLICOS: CAFEICO Y P-CUMÁRICO EN mg/g MUESTRA EN LA INFUSIÓN AL 2% Y EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Matricaria chamomilla* DETECTADOS POR HPLC, 2014.

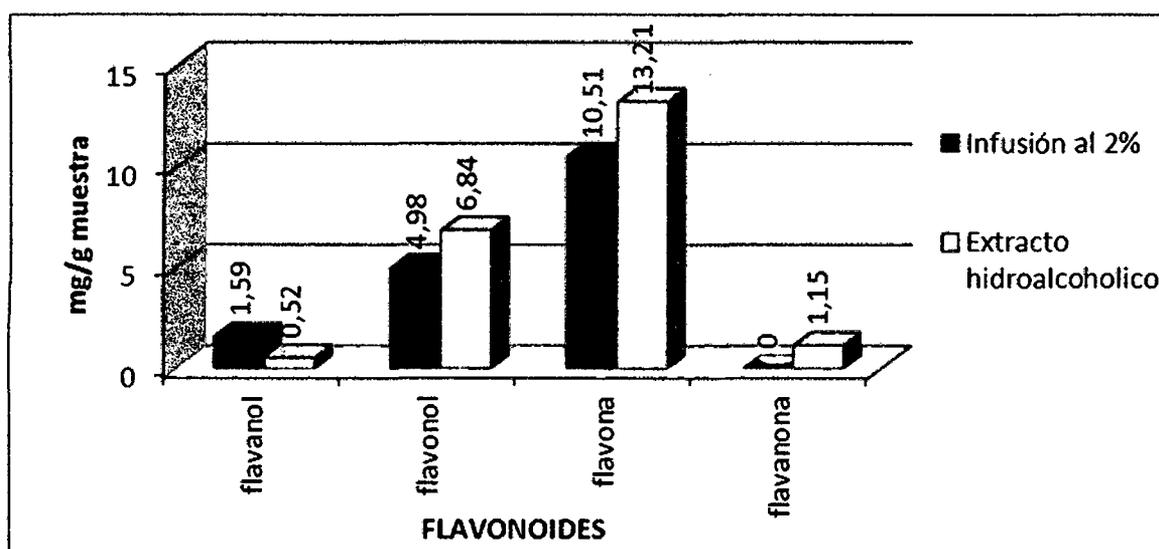


INTERPRETACIÓN

El extracto hidroalcohólico y la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* presentaron los ácidos fenólicos: p-cumárico y cafeico, aunque en diferentes concentraciones. El extracto hidroalcohólico presentó mayor concentración del ácido fenólico tipo p-cumárico y la infusión al 2% mayor concentración del ácido fenólico del tipo cafeico. Se determinó, que no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los ácidos fenólicos tipo cafeico ($t = 0.964$; $p = 0.349$) y entre los ácidos fenólicos tipo p-cumárico ($t = 0.818$; $p = 0.459$) presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

FIGURA 20

CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES: FLAVANOL, FLAVONOL, FLAVONA Y FLAVANONA EN mg/g MUESTRA EN LA INFUSIÓN AL 2% Y EN EL EXTRACTO DE *Matricaria chamomilla* DETECTADOS POR HPLC, 2014.

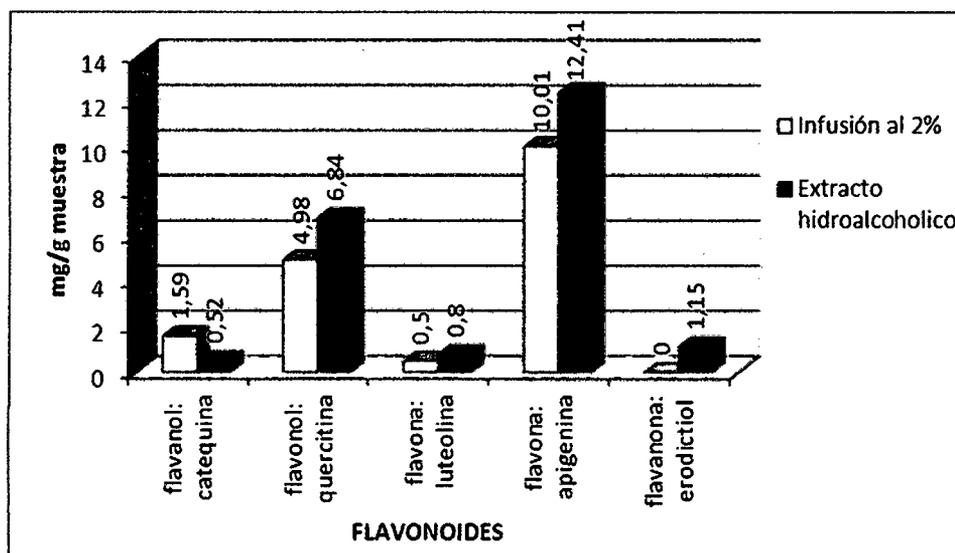


INTERPRETACIÓN

El extracto hidroalcohólico y la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* presentaron los tipos de flavonoides: flavanol, flavonol y flavona, aunque en diferentes concentraciones, sólo el extracto hidroalcohólico presentó flavanona, La infusión al 2%, presentó mayor concentración del flavonoide tipo flavanol y el extracto hidroalcohólico presentó mayor concentración de flavonoides tipo flavonol, flavona y flavanona. No existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los flavonoides tipo flavanol ($t = 1,095$; $p = 0,471$); entre los flavonoides tipo flavonol ($t = 0,026$; $p = 0,98$) y entre los flavonoides tipo flavona ($t = 0,401$; $p = 0,695$) presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

FIGURA 21

CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES: CATEQUINA, QUERCITINA, LUTEOLINA, APIGENINA Y ERODICTIOL EN mg/g MUESTRA EN LA INFUSIÓN AL 2% Y EN EL EXTRACTO DE *Matricaria chamomilla* DETECTADO POR HPLC, 2014.



INTERPRETACIÓN

La infusión al 2% y el extracto hidroalcoholico de *Matricaria chamomilla*, presentaron los flavonoides: flavanol tipo catequina, flavonol tipo quercitina y flavonas tipos luteolina y apigenina, aunque en diferentes concentraciones; sólo el extracto hidroalcohólico presentó flavanona tipo erodictiol. La infusión al 2% presentó mayor concentración de flavanol tipo catequina y el extracto presentó mayor concentración de flavonol tipo quercitina, flavonas tipo luteolina y apigenina. Se determinó que no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre el flavanol tipo catequina ($t = 1,095$; $p = 0.471$); entre el flavonol tipo quercitina ($t = 1,050$; $p = 0.318$); entre la flavona tipo luteolina, ($t = 0,289$; $p = 0.821$) y entre la flavona tipo apigenina ($t = 0,720$; $p = 0.49$), presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

4.2 DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como objetivos principales: evaluar el efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2%, 4% y 8% de la *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans* y comparar el perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*.

En relación a nuestro primer objetivo principal, los resultados de la presente investigación mostraron, que no existe efecto antibacteriano in vitro en las infusiones al 2%, 4% y 8% de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*. Resultados similares a los reportados por Modesto, Lima y Uzeda (2003), quienes concluyeron que la solución obtenida de la infusión de *Matricaria chamomilla*, no presentó efecto antibacteriano, independiente de su concentración y del origen del inóculo (saliva no estimulada o placa dental). También a los resultados de la investigación de Alvear (2007), sus resultados mostraron que las infusiones de manzanilla al 8%, no presentaron efecto antibacteriano, independiente de la concentración de la sustancia evaluada.

Los resultados observados en la presente investigación, fueron diferentes a los reportados por la investigación de Mirón (1997), quien después de experimentar distintas concentraciones, sus resultados mostraron que la inhibición del crecimiento del *Streptococcus mutans* y del *Lactobacillus acidophilus*, determinada a través del número de ufc/ml, fue evidente en la concentración al 10%, acercándose a los que sería la concentración mínima

ideal para su aplicación. Así también, a los resultados que obtuvieron Sainz de Net y Ruiz (2004), quienes concluyeron que los enjuagues de *Matricaria chamomilla*, ayudan a la no formación de la placa dentobacteriana que se forma alrededor de los brackets. A los resultados reportados por Rodríguez *et. al.*, (2013), que muestran que todos los pacientes del grupo que usaron el enjuague bucal de *Matricaria chamomilla* al 10%, presentaron una disminución de las ufc/ml de hasta el 95%, en comparación con los otros 2 grupos. El índice de placa y el índice de higiene oral fueron aceptables en todos los pacientes que usaron la manzanilla, no así en los demás pacientes.

Habiéndose evidenciado, según la investigación de Albuquerque *et. al.*, (2010), quienes concluyeron que el extracto de *Matricaria recutita* Linn. tiene actividad antimicrobiana comprobada frente al *Streptococcus mutans* (ATCC25175) y a otros microorganismos ensayados, mas su acción antimicrobiana para una determinada concentración del extracto, fue inferior a la acción de la clorexidina 0,12%. Así mismo, la investigación de Cárcamo, Oliva y Gonzales (2011), quienes concluyeron que la frecuencia de uso clínico del colutorio de manzanilla en base a el extracto de *Matricaria recutita* L., tipo manzanilla primavera Puelche (0,8% de alcohol, 10% de glicerina y 0,8% de extracto de *Matricaria recutita* L.), presenta una mayor disminución de carga bacteriana de *Streptococcus* y *Staphylococcus* Gram+ cada 4 a 6 horas.

Se plantea nuestro segundo objetivo principal, comparar el perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, dado que, no se reportan investigaciones que indiquen

que el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* no tiene efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*, pero si existen discrepancias en las investigaciones realizadas sobre el efecto antibacteriano de las infusiones de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

Mediante la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), se determinó el perfil de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico y en la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla*; análisis que se ha considerado pertinente e importante en la presente investigación, debido a que, a los compuestos fenólicos se les atribuye propiedades antibacterianas y el análisis comparativo del perfil de compuestos fenólicos presentes en las infusiones y en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* podría tener una relación también de causa-efecto de las propiedades antibacterianas de la *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*, en estas dos formas de extraer las propiedades de esta planta.

De forma general, en nuestros resultados se observó que la infusión al 2% y el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, mostraron perfiles cromatográficos ligeramente diferentes, que presentaban los mismos tipos de compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y flavonoides, sin embargo, hubieron diferencias en la distribución de los picos encontrados en ambos productos, así como, en su concentración.

Se observó que el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, presentó mayor concentración de compuestos fenólicos totales que la infusión al 2%

(26.95 y 37.51 mg/g muestra respectivamente), sin embargo, no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los compuestos fenólicos totales presentes en la infusión y en el extracto. El pico más representativos para la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* fue el picos 16 (derivado de flavona: apigenina, 4.19 mg/g muestra) y para la extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* fue el picos 25 (derivado de ácido cinámico tipo p-cumárico, 6.42 mg/g muestra).

El extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, presentó mayor concentración de ácidos fenólicos y flavonoides (17.08 y 21.72 mg/g muestra respectivamente) que la infusión al 2% (9,87 y 15,9 mg/g muestra respectivamente). Sin embargo, no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los ácidos fenólicos ($t = 1,553$; $p = 0.135$) y entre los flavonoides ($t = 0,65$; $p = 0.515$) presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

En cuanto a la presencia de tipos de ácidos fenólicos, tanto el extracto hidroalcohólico y la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* presentaron ácidos fenólicos tipo: p-cumárico y cafeico, aunque en diferentes concentraciones. El extracto hidroalcohólico presentó mayor concentración del ácido fenólico tipo p-cumárico y la infusión al 2% mayor concentración del ácido fenólico del tipo cafeico. Se determinó, que no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los ácidos fenólicos tipo cafeico ($t = 0.964$; $p = 0.349$) y entre los ácidos fenólicos tipo p-cumárico ($t = 0.818$; $p = 0.459$) presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

En relación a la concentración de flavonoides, tanto en el extracto hidroalcohólico y en la infusión al 2% de *Matricaria chamomilla* presentaron: flavanol, flavonol y flavona, aunque en diferentes concentraciones; sólo el extracto hidroalcohólico presentó flavanona. La infusión al 2% de *Matricaria chamomilla*, presentó mayor concentración del flavonoide tipo flavanol en comparación con el extracto hidroalcohólico (1,59 y 0,52 mg/g muestra respectivamente) y, el extracto hidroalcohólico en comparación con la infusión al 2% presentó mayor concentración de flavonoides tipo flavonol (6,84 y 4,98 mg/g muestra respectivamente) y flavona (13,21 y 10,51 mg/g muestra respectivamente). Se determinó que no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre los flavonoides tipo flavanol ($t = 1,095$; $p = 0,471$); entre los flavonoides tipo flavonol ($t = 0,026$; $p = 0,98$) y entre los flavonoides tipo flavona ($t = 0,401$; $p = 0,695$) presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

En relación a los tipos de flavonoides presentes en la infusión al 2% y el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, presentaron flavonoides: flavanol tipo catequina, flavonol tipo quercitina y flavonas tipos luteolina y apigenina, aunque en diferentes concentraciones; sólo el extracto hidroalcohólico presentó flavanona tipo erodictiol. La infusión al 2% presentó mayor concentración de flavanol tipo catequina (1,59 y 0,52 mg/muestra respectivamente) y el extracto hidroalcohólico presentó mayor concentración de flavonol tipo quercitina (6,84 y 4,98 mg/muestra respectivamente), flavonas tipo luteolina y apigenina (0,8 y 0,5; 12,42 y 10,01 mg/ g muestra respectivamente). Se determinó que no existe diferencia significativa ($p > 0,01$) entre el flavanol tipo catequina ($t = 1,095$; $p = 0,471$); entre el flavonol tipo quercitina ($t = 1,050$;

$p = 0.318$); entre la flavona tipo luteolina, ($t = 0,289$; $p = 0.821$) y entre la flavona tipo apigenina ($t = 0,720$; $p = 0.49$), presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

Muñoz *et. al.*, (2012), al evaluar el contenido fenólico, la capacidad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de infusiones comerciales al 2% de hierbabuena (*Mentha piperita* L.), limón (*Cymbopogon citratos*), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), árnica (*Heterotheca inuloides*) y boldo (*Peumus boldus molina*) de cuatro marcas diferentes, obtenidas en un supermercado. La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo por HPLC. Reportaron que la concentración de compuestos fenólicos totales en la marca A fue de 69.28, en la marca B, 61.84, en la marca C 62.61 y en la marca D 66.72 $\mu\text{g eq. AG/mL}$ respectivamente; en nuestra investigación determinamos la concentración de compuestos fenólicos totales de 26.95 mg/g muestra, valores muy inferiores a los reportados por este autor. En cuanto a la concentración de flavonoides totales, este autor reporta en la marca A 46.18, en la marca B 61.35, en la marca C 36 y en la marca D 51.48 $\mu\text{g eq. AG/mL}$ respectivamente. En nuestra investigación encontramos una concentración de 15,9 mg/g muestra, también valores muy inferiores a los determinados en nuestro estudio.

En las infusiones de manzanilla de las marcas D y C se identificaron el ácido cafeico, umbeliferona, apigenina y herniarina; mientras que para las marcas A y B, la quercetina también estuvo presente, además de los compuestos encontrados en las marcas D y C; sin embargo, hay que destacar que la mayoría de estos compuestos se encontraron en cantidades traza. En nuestra

investigación se identificó ácido cafeico, apigenina y quercetina, más no umbeliferona y herniarina.

La variación cualitativa y cuantitativa de compuestos fenólicos presente en las infusiones en nuestro estudio y en el de Muñoz *et. al.*, (2012), se puede atribuir a la variabilidad genética de las plantas, la composición del suelo, el clima, el método de cosecha, almacenamiento post cosecha, así como al muestreo y las prácticas de elaboración, tal como lo reportan Bravo y Jiménez (2011) en su investigación: estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos.

Por los resultados obtenidos en la presente investigación, probablemente más que un efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*, la acción de la infusión de *Matricaria chamomilla* sobre el control de la caries dental se debería a su acción sobre el incremento del flujo salival y su capacidad buffer salival (5,01), según los resultados del estudio realizado por Larrucea *et. al.*, (2013) titulado efecto inmediato de infusiones de consumo habitual en las propiedades salivales.

Es probable también, que la presencia de mayor concentración de compuestos fenólicos, principalmente del tipo flavonoides, presentes en el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* podrían favorecer sus propiedades antimicrobianas frente al *Streptococcus mutans* en comparación con la infusión al 2%, aunque, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,01$), lo que nos llevaría realizar más investigaciones al respecto.

CONCLUSIONES

No existe efecto antibacteriano in vitro en las infusiones al 2%, 4% y 8% de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*, probablemente porque la concentración de principios activos responsables de sus propiedades antibacterianas no están presentes en una concentración adecuada.

Existe efecto antibacteriano in vitro del colutorio de clorhexidina al 0,12% con un halo de inhibición promedio de 2.5 mm, comprobándose una vez más su efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.

No se compara el efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans* de las infusiones 2%, 4%, 8% de *Matricaria chamomilla* y del colutorio de clorhexidina al 0,12% porque no existe efecto antibacteriano in vitro en las infusiones de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*.

La infusión de *Matricaria chamomilla*, presentó una concentración de compuestos fenólicos totales de 26,95 mg/g muestra, una concentración de

ácidos fenólicos de 17.08 mg/g muestra y una concentración de flavonoides de 9,87 mg/g muestra,

El extracto hidroalcoholico de *Matricaria chamomilla*, presentó una concentración de compuestos fenólicos totales de 37,51 mg/g muestra, una concentración de ácidos fenólicos de 21.72 mg/g muestra y una concentración de flavonoides de 15,9 mg/g.

La infusión al 2% y el extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla*, mostraron perfiles cromatográficos ligeramente diferentes, que presentaban los mismos tipos de compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y flavonoides, sin embargo, hubo diferencias en la distribución de los picos encontrados en ambos productos, así como, en su concentración. No existiendo diferencia significativa ($p > 0,01$) entre la concentración de compuestos fenólicos totales, ni en la concentración de ácidos fenólicos y flavonoides, presentes en la infusión al 2% y en el extracto hidroalcohólico.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* sobre el *Streptococcus mutans*, en manzanilla cultivada en nuestra zona.
- Realizar los análisis por HPLC, para la identificación completa de los derivados de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico y en el aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* de nuestra zona.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, A.C.L., Pereira, M.S.V., Costa M.R.M., Pereira, L.F. y Higino, J.S. (2010). Efeito antimicrobiano do extrato da *Matricaria recutita* Linn. (camomila) sobre microrganismos do biofilme dental. *Pesq Bras Odontope Clin Integr, Joao Pessoa, 10(3)*, 451-455.
- Alvear, A.M. (2007). *Determinación in vitro de la actividad antibacteriana de soluciones empleadas para la higiene bucal del bebe*. (Tesis de Titulo de Especialidad en Odontopediatria inédita). Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador.
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (2011). Formulario de Fitoterápicos da Farmacopea Brasileira / Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Brasilia: Anvisa. Recuperado: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf.
- Ávalos, A., Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, 2 (3)*, 119-145.
- Baca, P., Llodra, J.C. y Junco, P. (1996). Antisépticos y desinfectantes en odontoestomatología. En: Liébana J, y Bagán J.V., (Eds). *Terapéutica*

antimicrobiana en odontoestomatología. Madrid, España: Mac Graw-Hill Interamericana.

- Baca, P. (2005). Caries: fundamentos actuales de su prevención y control. En: Cuenca, E. y Baca, P., (Eds). *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones*. Barcelona, España: Masson.
- Bascones, A. y Morante, S. (2008). Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances en Periodoncia*, 18 (1), 31-59.
- Bernimoulin, J.P. (2003). Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol*, 30 (5), 7-9.
- Bravo M.L. y Jimenez, G.N. (2011). *Estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos*. (Tesis de título profesional inédita). Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Cabrita, M.J., Torres, M., Palma, V., Alves, E., Patao, R., y Costa, A.M. (2007). Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta*, 74 (5), 1281-1286.
- Cabronero Fernández, M.J. (1991). *Estudio de Streptococcus mutans en un modelo experimental. Aportaciones etiopatogenicas*. (Tesis de doctorado inédita). Universidad Complutense de Madrid. Madrid-España.
- Calsina, G. y Serrano, J. (2005). ¿Existen realmente diferencias clínicas entre las distintas concentraciones de clorhexidina? Comparación de colutorios. *RCOE*, 10 (4), 457-464.
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E. y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Lat Am J Pharm*, 22 (3), 265-278.

- Carcamo, V., Oliva, P. y González, P. (2011). Efectividad antimicrobiana del colutorio de *Matricaria recutita*, en funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo. *Int. J. Odontoestomat*, 5 (2), 179-184.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000). Natural products. In: Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzeby, J., and Tindall, B.J. (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 Michigan State University Board of Trustees. DOI: 10.1601/TOBA7.7 . Recuperado: <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/190/223>.
- Clarke, J.K.K. (1924). On the bacterial factor in the a etiology of dental caries. *Br J Exp Pathol*, 5, 141-147.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A.G. y Van Berkel, W.J. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology*, 1, 21-38.
- Duque de Estrada, J., Pérez, J.A., y Hidalgo-Gato, I. (2005). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev Cub Estomatología*, 43 (1).
- Ezoubeiri, A., Gadhi, C. A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., y Vanhaelen, M. (2005). Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 (2), 287–292.

- Gamboa, F., Herazo, B. y Martínez, M. C. (2004). Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción cariogénica. *Universitas Scientiarum*. 9 (4), 5-55.
- Grippaudo, G. (1995). Estudio clínico sobre la eficacia de un nuevo tipo de removedor de la placa bacteriana. *J. Periontol*, 1(2), 995-996.
- Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S.L. y Kaushik, D. (2010). Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2 (1), 12-16.
- Hamada, S., Koga, T. y Ooshima, T. (1984). Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries preventive. *J. Dent. Res*, 63 (3), 407-411.
- Klock, B. y Krasse, B. (1979). A comparison between different methods for prediction of caries activity. *Scand J Dent Res*, 87 (2), 129-139.
- Larrucea, C., Henriquez, E., Inostroza, M., Campos, L., Peña, C., Larrucea, C., Arenas, M. y Larrucea, K. (2013). Efecto inmediato de infusiones de consumo habitual en las propiedades salivales. *Int. J. Odontostomat*, 7(3), 343-349.
- Liébana, J., Gonzales, M., Liebana, M.J. y Parra, M. (2002). Composición y ecología de la microbiota oral. En Liébana J, ed. *Microbiología Oral* (2ª ed.). Madrid, España: Mac Graw-Hill Interamericana.
- Marsh, P.D. (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am*, 43, 599-614.
- Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Recuperado: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides.pdf>.

- Martínez-Valverde, I., Periago, M., y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 5-18.
- Marzal, C. (2012). *Estudio de la mucosa oral en pacientes que emplean colutorios*. (Tesis doctoral inédita). Universidad de Valencia, Valencia - España.
- Mathur, S., Mathur, T., Srivastava, R. y Khatri, R. (2011). Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. *National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology*, 1(2):45-50.
- McNeill, F.R., Barrie, H.M., Burdet, V., Demoulin, D.L., Hawksworth, K., Marhol, D.H., Nicolson, J., Prado, P.C., Silva, J.E., Skog, J.H. y Wiersema N.J. Turland. (2005). Editors - Compilers. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria.
- Ministerio de salud. (2005). Salud bucal Ministerio de Salud. Recuperado: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm.
- Ministerio de salud. (2010). Oficina General de Estadística e Informática MINSA. Recuperado: <http://www.minsa.gob.pe/estadisticas/estadisticas/morbilidad/CEMacros.asp?21>.
- Mirón Cárcamo, L. M. (1997). *Efecto inhibitorio de la infusión de manzanilla (Matricaria chamomilla) sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos*. (Tesis de título profesional inédita). Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Modesto, A., Lima, K.C. y Uzeda, M. (2003). Estudio sobre la actividad antimicrobiana de soluciones utilizadas en la higiene bucal del bebe. *Odontopediatría odontol bebe*, 6 (29), 18-23.
- Molgantini, S. y Manto, M.C. (2010) Pruebas de sensibilidad in vitro a los agentes antimicrobianos. En: Negroni, M. (Eds). *Microbiología estomatológica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial médica Panamericana.
- Morante Mudarra, S. (2003). *Valoración cruzada y a doble ciego, mediante el modelo de gingivitis experimental, de la eficacia de tres colutorios de clorhexidina sin alcohol frente a la prevención de gingivitis y a la neoformación de placa supragingival*. (Tesis de doctorado inédita). Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España.
- Muñoz, E.E., Rivas, K., Loarca, G.F., Mendoza, S., Reynoso, R. y Ramos, M. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3 (31), 481-495.
- Newbrun, E. (1991). *Cariología*. México: Limusa.
- Ojeda, J.C., Oviedo, E. y Andres, L. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *Rev. CES Odont*, 26 (1) 44-56.
- Peterson, J. y Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18 (12), 1995-2018.
- Picada, R., Fachinetto, R., De Souza, A., Luiz, R., Narjar, G., Heinzman, B.M., Krapf, T., Linde, M., Escobar, M., Farias, A., María, V. y Texeira, J.B. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res*, 34, 973–983.

- Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M.R., Zehtab-Salmasi, S. y Moammadi, A. (2006). Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *J Agron*, 5 (3), 451-455.
- Povh, N.P., Marques, M.O.M. y Meireles, M.A.A. (2001). Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* L.). *J. Supercrit. Fluids*, 21, 245–256
- Rodríguez, M.C., Da Silveria, R.P., Vázquez, E.M. y Calafell, R.A. (2013). Acción antimicrobiana del enjuague de *Matricaria chamomilla* en pacientes tratados ortodónticamente en una clínica de especialidad. *Medicina salud y sociedad*, 4 (1).
- Sainz de Net, T. y Ruiz, J. (2004). Estudio de flora bacteriana en pacientes tratados ortodónticamente, aplicando enjuagues bucales de *Matricaria chamomilla* "manzanilla". Recuperado: <http://www.odontologia-online.com/casos/part/JRC/>.
- Snijman, P.W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, J.R., Gelderblom, W. C. y (2007). The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some doseresponse effects on mutagen activation–flavonoid interactions. *Mutat Res*, 631 (2),111-123.
- Tarnawski, M., Depta, K., Grejciun D. y Szelepin, B. (2006). HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 182–188.
- Troncoso, N., Sierra, H., Carvaja, L., Delpi,, P. y Günthe, G. (2005). Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible

- quantification of principal phenolic antioxidants in *Fresh rosemary*. *J Chromatogr R*, 1100 (1), 20-25.
- Tsao, R. y Deng, Z. (2004). Review: Separation prokedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr B Analyt Biomed Life Sci*, 812 (1), 85-99.
 - Ullman, R.F., Miller, S.J., Strampfer, M.J. y Cunha, B.A. (1988). *Streptococcus mutans* endocarditis: report of three cases and review of the literature. *Heart Lung*, 17 (2), 209-212.
 - Umar, J., Muni, A., Hameed, A. y Ahmed, S. (2005). Salivary count of *Streptococcus mutans* in caries prediction. *Pakistan oral & Dent. Jr.* 25 (1).
 - World Health Organization. (2003). The World Oral Health Report. Geneva: WHO. Recuperado: http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2009/OH_st_WHO.pdf.

ANEXOS

ANEXO 1

Constancia de la desecación de la *Matricaria Chamomilla L.* y de la preparación de las concentraciones de la infusión, emitida por el Jefe del laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía - Facultad de Ciencias Agrarias, UNA – Puno



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGRONOMICA



CONSTANCIA

EL JEFE DE LABORATORIO DE FITOPATOLOGIA DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, DEJA CONSTANCIA QUE:

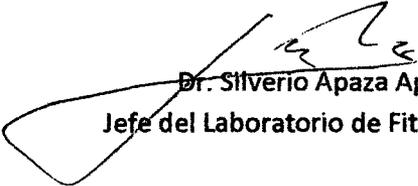
La Mg. Mirelia Janeth Talavera Apaza ha realizado los siguientes procedimientos para la investigación "Efecto antibacteriano in vitro de infusión de MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) sobre *Streptococcus mutans* - Puno 2013":

- Dsecación natural de las inflorescencias de *Matricaria chamomilla* L.
- Prueba piloto de la preparación de las concentraciones de la infusión de *Matricaria chamomilla* L. y determinar su viabilidad para realizar los análisis de la investigación mencionada.

Se realizó la desecación en aproximadamente 17 días.

Se estableció las concentraciones del 2%, 4% y 8% de infusión de *Matricaria chamomilla* L. como viables para los análisis a realizarse.

Se expide la presente **Constancia** a solicitud de la parte interesada, para los fines y usos a que hubiera lugar; a los siete días del mes de octubre del año dos mil trece.


Dr. Silverio Apaza Apaza
Jefe del Laboratorio de Fitopatología

ANEXO 2

Constancia de identificación y caracterización botánica del material vegetal (*Matricaria Chamomilla L.*) emitida por el Jefe del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNALM - Lima.



La Molina, 14 de enero, 2014

CONSTANCIA

Se informa a través de la presente que el espécimen procedente del poblado de Jayihualla (Dpto. De Puno, Prov. de Puno, Dpto. de Puno), remitido por la Srta. Mirelia Janeth Talavera Apaza como parte de su proyecto de tesis "Efecto Antibacteriano in vitro de infusión de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) sobre *Streptococcus mutans*. Puno 2013", ha sido estudiado para su determinación taxonómica en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL). El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tal muestra permiten concluir que la misma corresponde a la especie *Matricaria chamomilla* L.

A continuación se adjuntan dos cuadros con la sistemática de la especie identificada conforme a Cronquist¹ y The Angiosperm Phylogeny Group (APG III)².



Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel
Jefe Herbario de la Facultad de Ciencias (MOL)
Universidad Nacional Agraria La Molina

Arturo Granda Paucar
Investigador
Herbario de la Facultad de Ciencias (MOL)

¹ : Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press, New York.

² : The Angiosperm Phylogeny Group. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161: 105-121.

I.- Sistemática de *Matricaria chamomilla* L. de acuerdo a Cronquist (1981):

División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Matricaria* L.
Especie : *Matricaria chamomilla* L.

II.- Sistemática de *Matricaria chamomilla* L. de acuerdo a la APG (1998) y APG III (2009):

Clado : angiospermas
Clado : eudicocotiledóneas
Clado : gunnéridas
Clado : pentapétalas (pentapetalae)
Clado : astéridas
Clado : campanúlidas
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Matricaria* L.
Especie : *Matricaria chamomilla* L.

ANEXO 3

Certificado de la cepa ATCC®25175 del proveedor

ANEXO 4

Informe de ensayo de la preparación de las infusiones al 2%, 4% y 8% de la *Matricaria Chamomilla L.* y de la realización del test de difusión por disco para evaluar las propiedades antimicrobianas de la *Matricaria Chamomilla L.* sobre el *S. Mutans* emitido por el Jefe del laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM– Lima.



INFORME DE ENSAYO N° 14- EI -01 - LMT

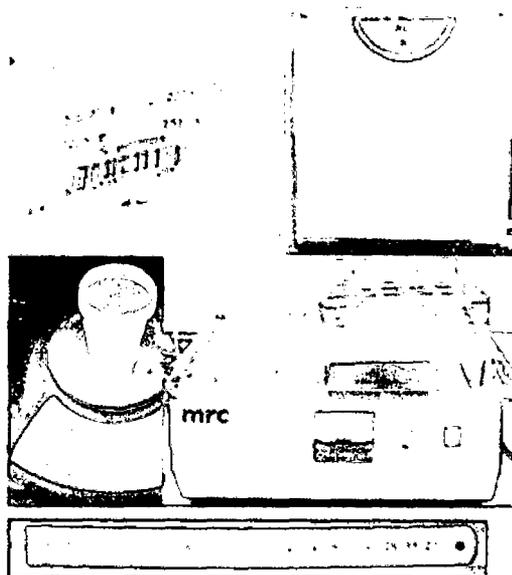
SOLICITANTE : MIRELIA JANETH TALAVERA APAZA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

ENSAYO : "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE INFUSIÓN DE MANZANILLA
(*Matricaria chamomilla* L.) SOBRE *Streptococcus mutans* - PUNO 2013"

MATERIALES:

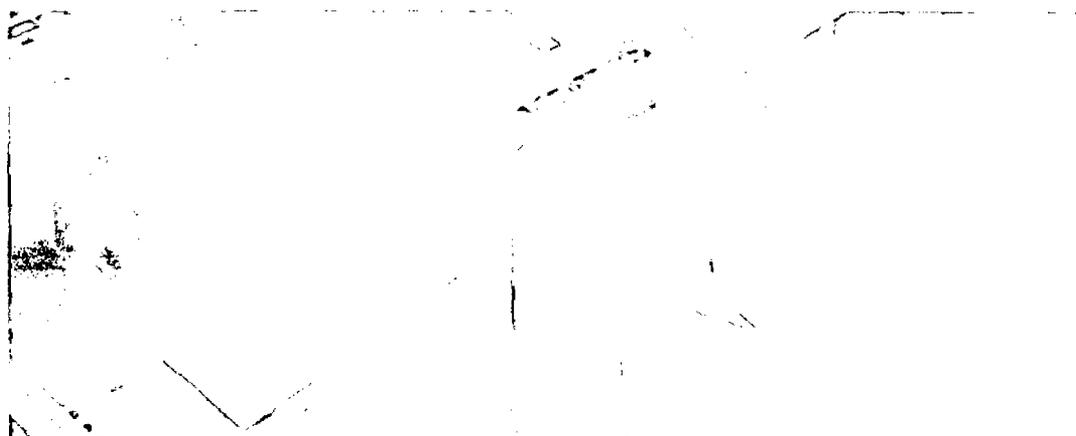
- Placas Petri de plástico de 90 x 10 mm.
- Agar Mueller-Hinton (MHA)
- Cepa de *S. mutans* ATCC@25175
- Asas de siembra
- Balanza Scout Pro de 600g
- Filtro de 40 um. De poro
- Envases para muestras estériles de 100 mL.
- Micropipetas de 100 – 1000 uL y de 10 – 100 uL.
- Agua cielo estéril
- Tips de 100 y 1000 uL.
- Espectrofotómetro Spectronic GENESYS 6
- Asas de digralsky
- Perio-Aid: Colutorio de clorhexidina al 0,12%
- Inflorescencias de *Matricaria chamomilla* L.
- Regla de metal INCH Stanless de 20cm
- Incubadora de 35°C INCUCCELL
- Orbital Shaker MRC



PROCEDIMIENTO:

1. REACTIVACIÓN DE LA CEPA

Según lo indicado en el envase se procedió a extraer el hisopo que se encontraba en el contenedor de la cepa de *S. mutans*, se realizó la siembra en una placa de MHA y se incubó a 35°C por 24 horas. De esta cepa reactivada se inoculó una asada en caldo nutritivo por un periodo de 24 horas a 28°C en movimiento constante.





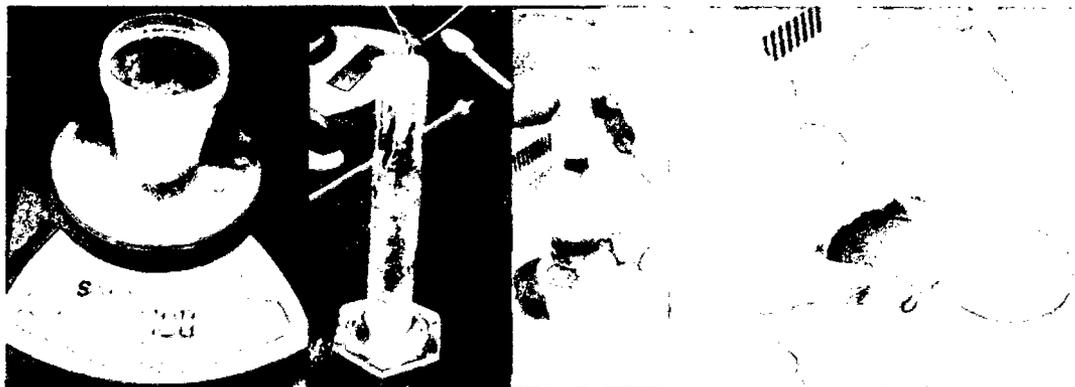
2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Del cultivo de *S. mutans* de 24 horas se extrajo una alícuota de 1000 uL y se procedió a medir la absorbancia del inóculo al espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm. A partir de este se realizó una dilución en caldo nutritivo hasta alcanzar los 0.5 McFarland. De esta dilución se agregó 100 uL a cada placa y se extendió con un asa de digralsky, luego, se dejó secar por aproximadamente 15 minutos.



3. PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN

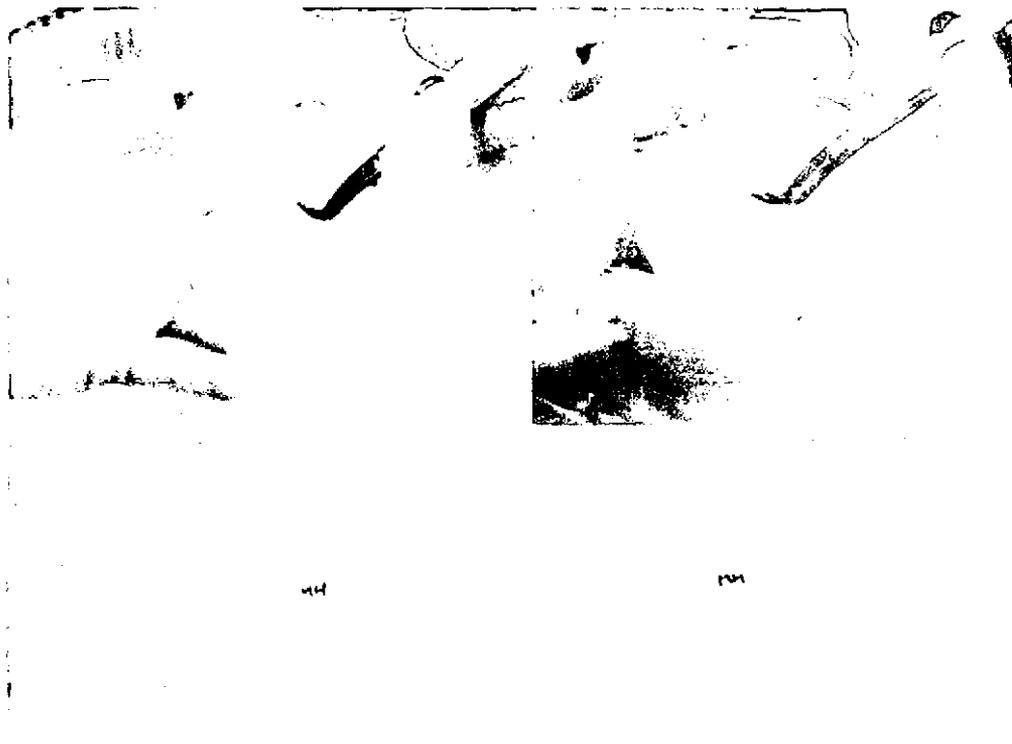
Para la infusión se pesó 4 g de inflorescencias de manzanilla y se le agregó 50 mL (infusión 8%) de agua hervida y se puso en reposo por 5 minutos, luego se procedió a filtrar. El líquido obtenido fue esterilizado por filtración en un embudo con papel filtro estéril de 22um de poro, a partir de ella se realizaron las infusiones de 4 y 2% con la misma agua mineral que se usó para el control negativo.





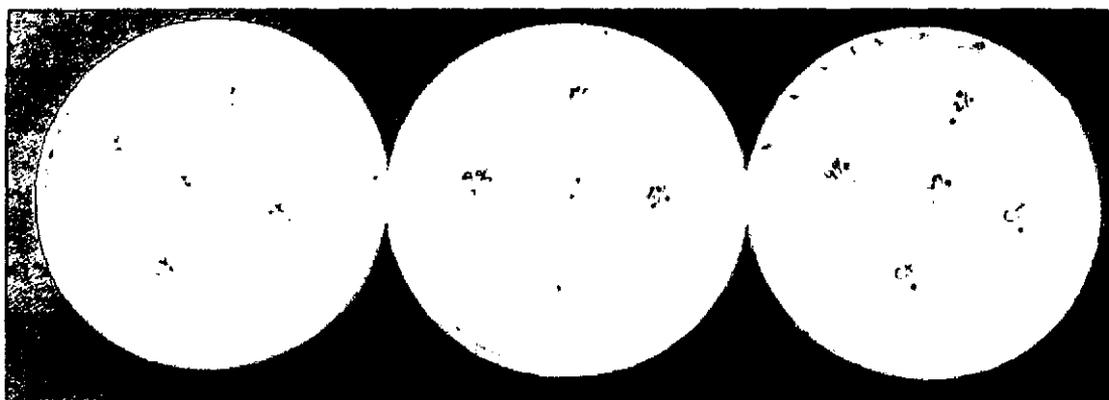
4. COLOCACIÓN DISCOS DE ANTIMICROBIANO

Se sumergieron 5 discos de 5mm de diámetro y 0.02 mm de espesor en cada una de las infusiones (8%, 4% y 2%) y en los controles positivo, Clorhexidina al 0,12% (C+) y negativo, agua mineral cielo (C-) se dejó en incubación a 35°C por 24 horas y se procedió a medir los halos con una regla de metal INCH Stanless de 20cm.



5. MEDICIÓN DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN

Después de retirar la placa de la incubadora, se examinó detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano.





6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

No hubo presencia se formación de halos en los tratamientos con infusión de manzanilla ni en el control negativo, sin embargo en el control positivo se observó un halo de 2.5 cm. de diámetro en promedio.

TRATAMIENTOS, REPETICIONES Y UNIDADES EXPERIMENTALES

Tabla 1. Tratamientos, productos y concentración en estudio.

TRATAMIENTOS	PRODUCTO Y CONCENTRACIÓN
T1	Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> L. al 2%
T2	Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> L. al 4%
T3	Infusión de <i>Matricaria chamomilla</i> L. al 8%
T4	Colutorio de clorhexidina al 0,12%
T5	Agua cielo esterilizada

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Tratamientos, repeticiones y unidades experimentales

REPETICIONES	TRATAMIENTOS				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	0	0	0	2.5	0
R2	0	0	0	2.6	0
R3	0	0	0	2.4	0

Fuente: Elaboración propia

La Molina, 30 de junio de 2014

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 799 5788 / 614 7800 anexo 274
E-mail: imt@lamolina.edu.pe



ANEXO 5

Informe de resultado de análisis de perfil de compuestos fenólicos de la infusión al 2% y del extracto *Matricaria Chamomilla L.* por HPLC emitida por el Jefe del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la UNALM.

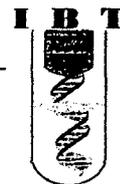
RESULTADOS DE ANÁLISIS*

CLIENTE: Mirelia Talavera Apaza
R.U.C.:
MUESTRA: Manzanilla

A.1. Resultados de perfil de compuestos fenólicos de la infusión de la manzanilla

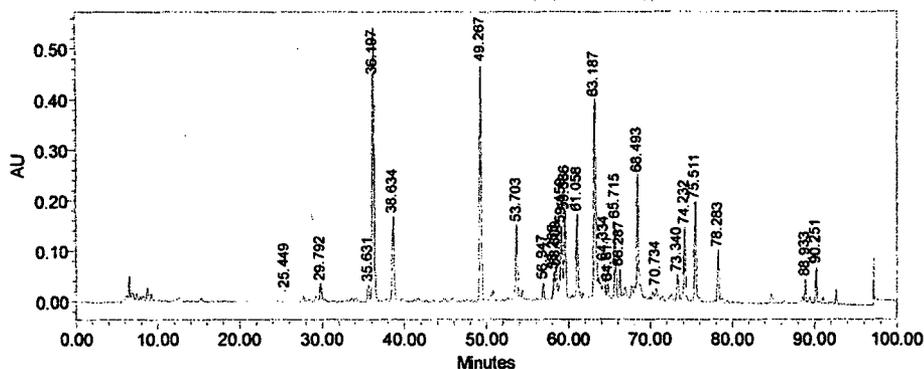
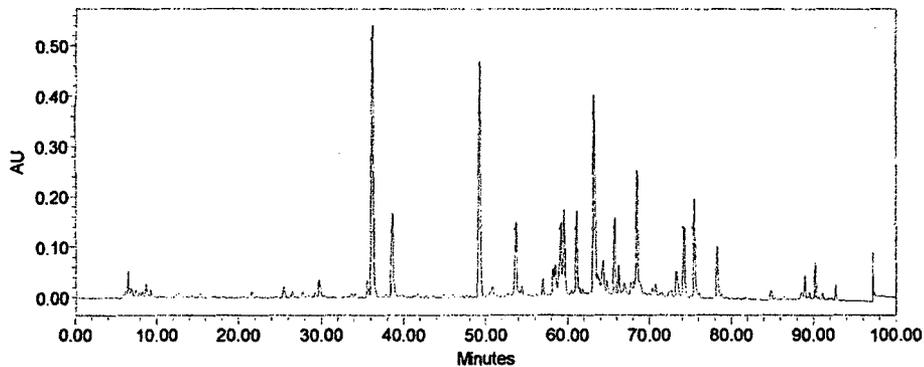
	Tiempo de retención (min)	L.O.*	Concentración (mg/g muestra)	Compuesto fenólico asignado
1	25.44	320 nm	0.12	Derivado de ácido cinámico ^a
2	29.79	280 nm	0.94	Derivado de flavanol ^b
3	35.63	320 nm	0.20	Derivado de ácido cinámico ^a
4	36.19	320 nm	1.55	Derivado de ácido cinámico ^a
5	38.63	320 nm	3.06	Clorogénico
6	49.26	320 nm	2.21	Derivado de ácido cinámico ^a
7	50.82	320 nm	0.08	Derivado de ácido cinámico ^a
8	53.70	360 nm	1.07	Derivado de flavanol ^c
9	56.94	280 nm	0.65	Derivado de flavanol ^b
10	58.25	360 nm	0.54	Derivado de flavanol ^c
11	58.51	320 nm	0.50	Derivado de flavona ^d
12	59.15	360 nm	1.27	Derivado de flavanol ^c
13	59.59	360 nm	1.26	Derivado de flavanol ^c
14	61.05	320 nm	0.68	Derivado de ácido cinámico ^a
15	61.81	320 nm	0.05	Derivado de ácido cinámico ^a
16	63.18	320 nm	4.19	Derivado de flavona ^e
17	64.33	360 nm	0.61	Derivado de flavanol ^c
18	64.81	320 nm	0.13	Derivado de ácido cinámico ^a
19	65.71	320 nm	0.74	Derivado de ácido cinámico ^a
20	66.28	320 nm	0.19	Derivado de ácido cinámico ^a
21	67.80	360 nm	0.23	Derivado de flavanol ^c
22	68.49	320 nm	1.71	Derivado de flavona ^e
23	70.73	320 nm	0.09	Derivado de ácido cinámico ^a
24	73.33	320 nm	0.45	Derivado de flavona ^e
25	74.23	320 nm	1.17	Derivado de flavona ^e
26	75.51	320 nm	1.64	Derivado de flavona ^e
27	78.28	320 nm	0.85	Derivado de flavona ^e
28	88.93	320 nm	0.29	Derivado de ácido cinámico ^f
29	90.25	320 nm	0.48	Derivado de ácido cinámico ^f
Total			26.96	

*Promedio de tres repeticiones

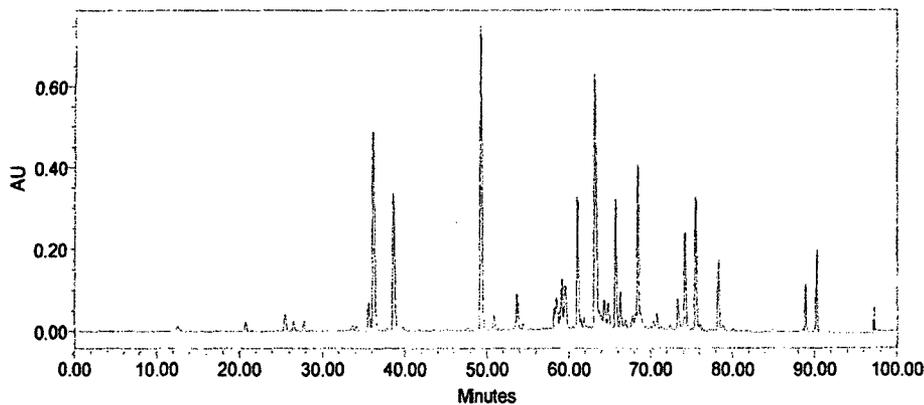


^aCuantificado como cafeico a 320 nm, ^bCuantificado como catequina a 280 nm, ^ccuantificado como quercitina a 360 nm, ^dCuantificado como luteolina a 320 nm, ^eCuantificado como Apigenina a 320nm, ^fCuantificado como p-cumárico a 320 nm.
*Longitud de onda de cuantificación

Cromatograma a 280 nm



Cromatograma a 320 nm



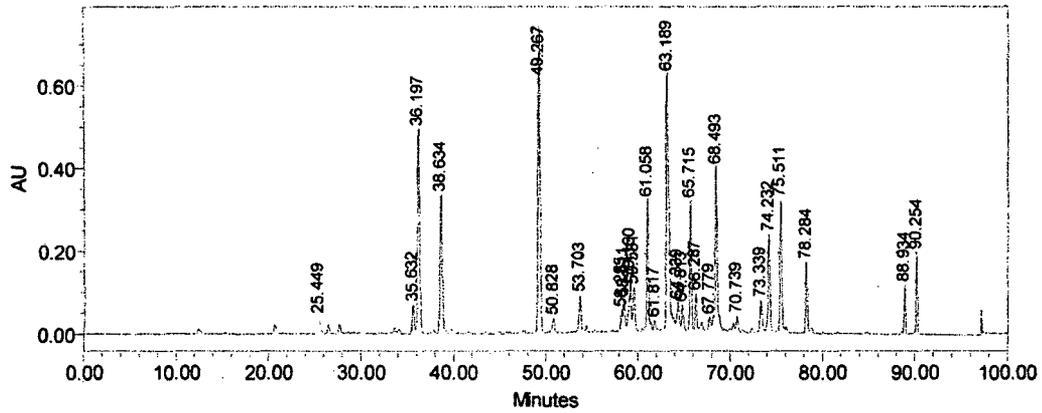


Universidad Nacional Agraria La Molina

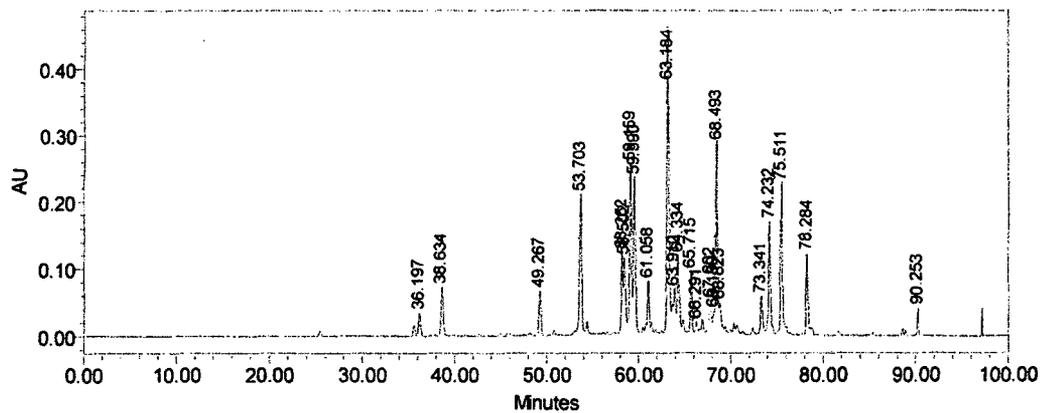
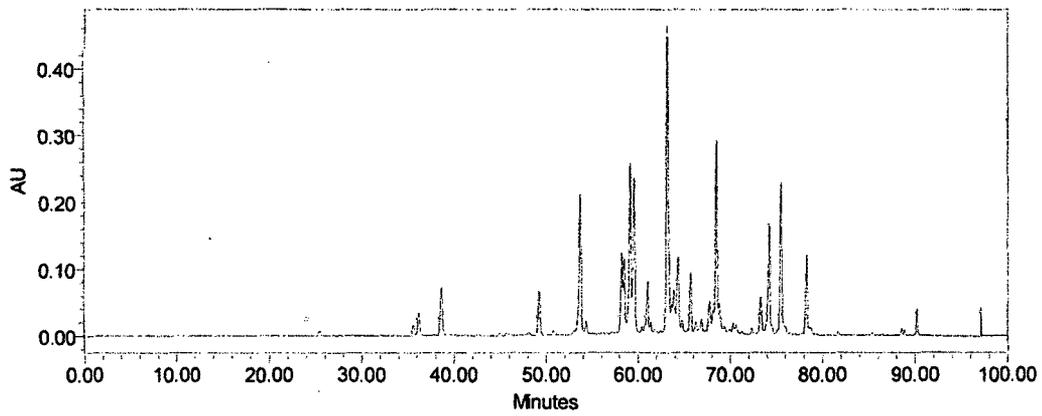
Instituto de Biotecnología - Biotecnología Industrial



Av. La Molina s/n. La Molina Apdo. 12056. Lima-Perú. Telf. 614-7800 Anexo 436
<http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/>
ibtbi@lamolina.edu.pe



Cromatograma a 360 nm



A.2. Resultados de perfil de compuestos fenólicos del extracto de la manzanilla*

	Tiempo de retención (min)	L.O.**	Concentración (mg/g muestra)	Compuesto fenólico asignado
1	36.368	320 nm	1.677	Derivado de ácido cinámico ^a
2	38.796	320 nm	1.202	Ácido clorogénico
3	49.431	320 nm	2.315	Derivado de ácido cinámico ^a
4	50.979	320 nm	0.074	Derivado de ácido cinámico ^a
5	53.881	360 nm	1.389	Derivado de flavonol ^c
6	57.123	280 nm	0.520	Derivado de flavanol ^b
7	58.447	360 nm	0.600	Derivado de flavonol ^c
8	58.721	320 nm	0.600	Derivado de flavona ^d
9	59.359	360 nm	1.643	Derivado de flavonol ^c
10	59.791	360 nm	1.866	Derivado de flavonol ^c
11	61.270	320 nm	0.972	Derivado de ácido cinámico ^a
12	63.471	320 nm	5.660	Derivado de flavona ^e
13	64.150	360 nm	0.436	Derivado de flavonol ^c
14	64.576	360 nm	0.899	Derivado de flavonol ^c
15	65.964	320 nm	0.993	Derivado de ácido cinámico ^a
16	68.042	320 nm	0.200	Derivado de flavona ^d
17	68.774	320 nm	1.835	Derivado de flavona ^e
18	69.803	320 nm	0.366	Derivado de ácido cinámico ^f
19	70.227	320 nm	0.211	Derivado de flavona ^e
20	74.535	320 nm	4.221	Derivado de flavona ^e
21	75.821	320 nm	0.494	Derivado de flavona ^e
22	85.102	280 nm	1.146	Derivado de flavanona ^g
23	85.619	320 nm	0.827	Derivado de ácido cinámico ^f
24	88.989	320 nm	0.953	Derivado de ácido cinámico ^f
25	90.260	320 nm	6.417	Derivado de ácido cinámico ^f
Total			37.51	

*Promedio de tres repeticiones

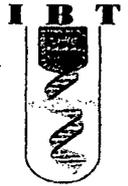
^aCuantificado como cafeico a 320 nm, ^bCuantificado como catequina a 280 nm, ^ccuantificado como quercitina a 360 nm, ^dCuantificado como luteolina a 320 nm, ^eCuantificado como Apigenina a 320nm, ^fCuantificado como p-cumárico a 320 nm, ^gCuantificado como eriodictiol.

**Longitud de onda de cuantificación

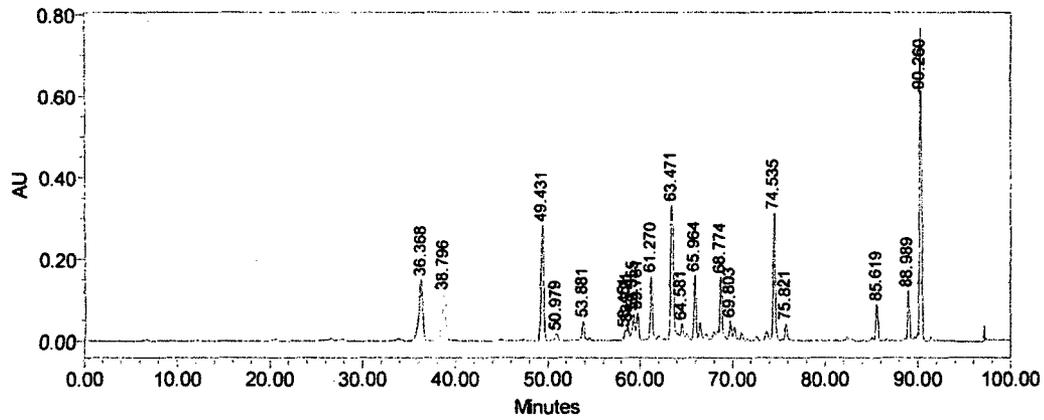


Universidad Nacional Agraria La Molina

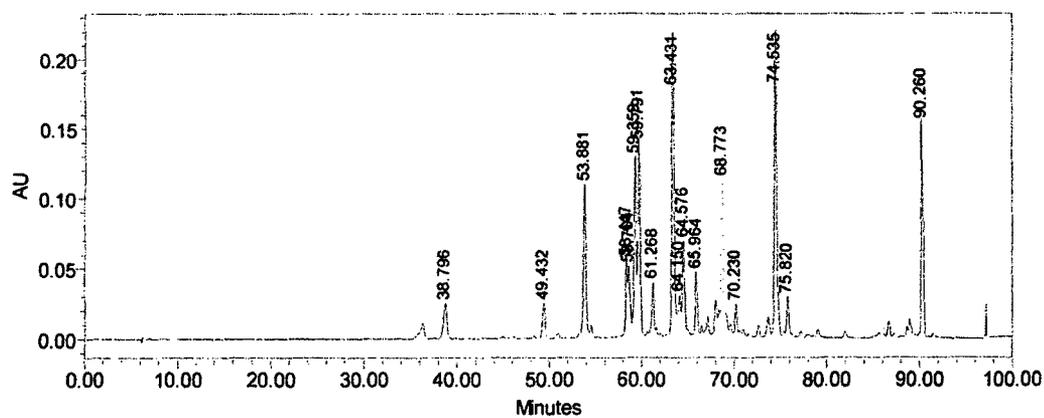
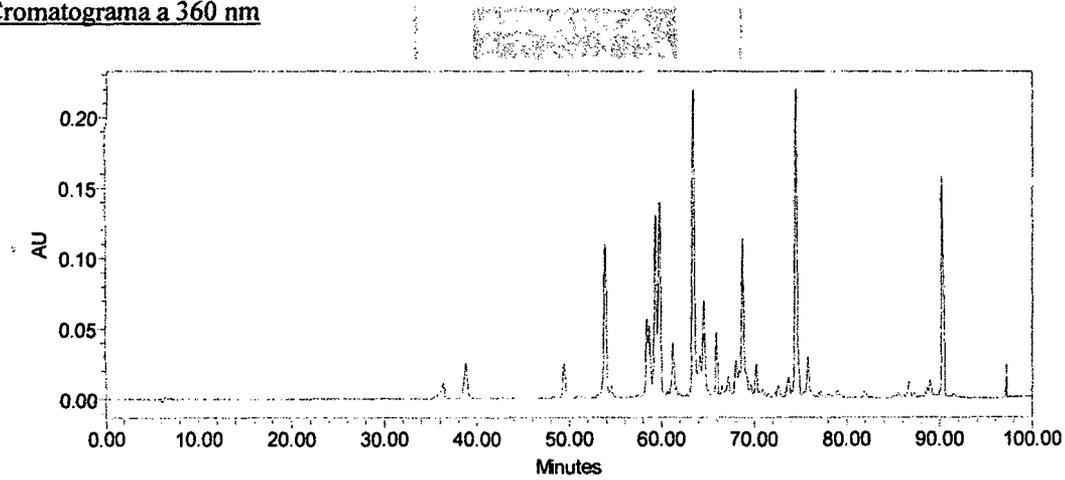
Instituto de Biotecnología - Biotecnología Industrial

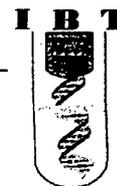


Av. La Molina s/n. La Molina Apdo. 12056. Lima-Perú. Telf. 614-7800 Anexo 436
<http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/>
ibtbi@lamolina.edu.pe

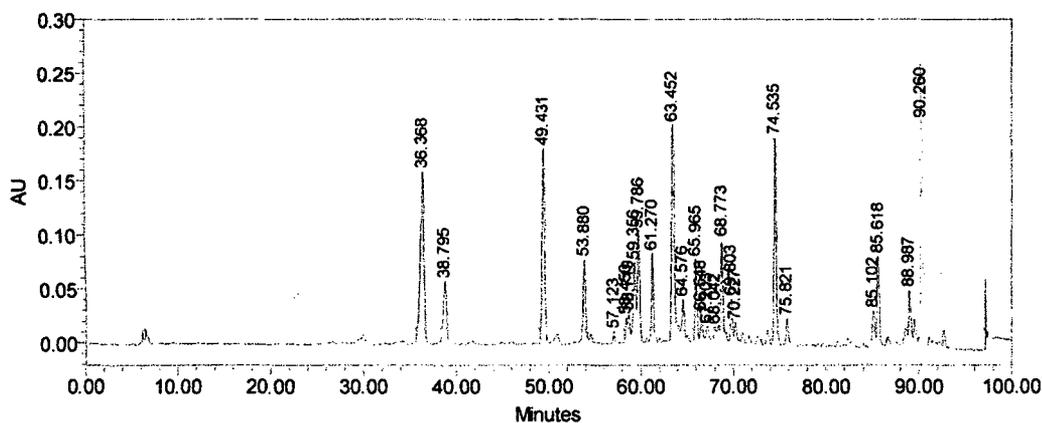
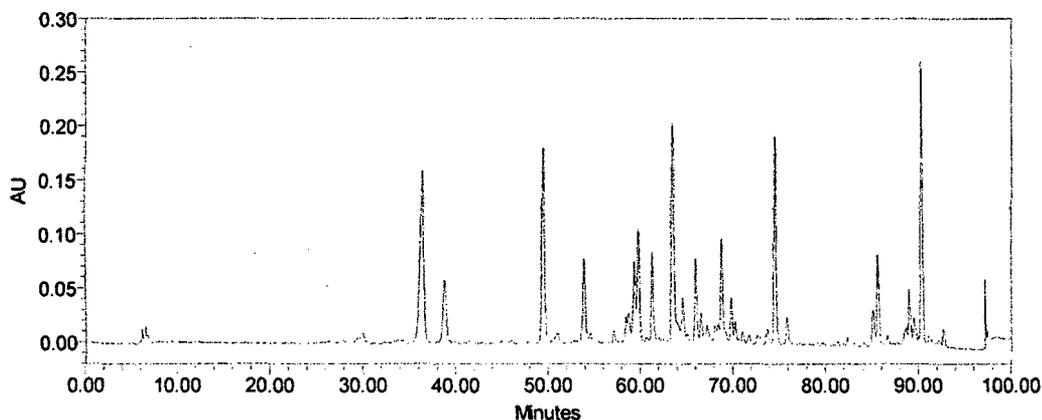


Cromatograma a 360 nm

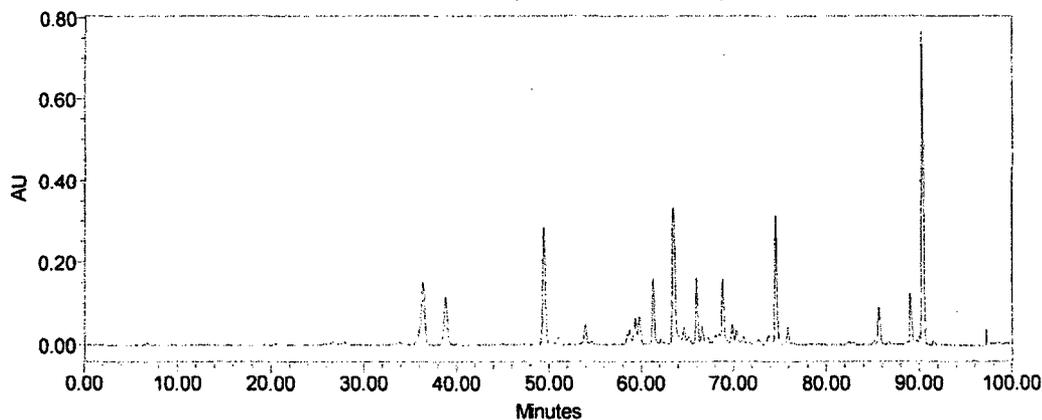




Cromatograma a 280 nm



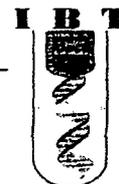
Cromatograma a 320 nm





Universidad Nacional Agraria La Molina

Instituto de Biotecnología - Biotecnología Industrial



Av. La Molina s/n. La Molina Apdo. 12056. Lima-Perú. Telf. 614-7800 Anexo 436
<http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/>
ibtbi@lamolina.edu.pe

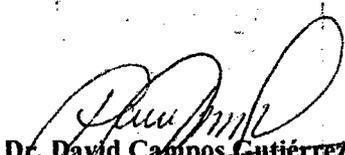
¹ Método HPLC, tomado de: Rosana Chirinos, Mauricio Huamán, Indira Betalleluz-Pallardel, Romina Pedreschi, David Campos (2011). Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*, 128, 711–716.

Advertencia:

- El muestreo y las condiciones de manejo de las muestras hasta su ingreso a los Laboratorios del IBT -UNALM son de responsabilidad del solicitante
- Los resultados son válidos sólo para muestra recibida

Fecha de realización de los ensayos: de 15/4/14 al 24/4/14

La Molina, 24 de Abril del 2014.


Dr. David Campos Gutiérrez
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

