



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
TRES ESPECIES VEGETALES DE LA FAMILIA Euphorbiaceae
FRENTE A UNA CEPA DE INTERÉS
PERIODONTOPATOGÉNICA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MAYERLI LISSETH LEÓN GARÓFALO

DIRECTORA: Bqf. GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA

Riobamba – Ecuador

2024

© 2024, Mayerli Lisseth León Garófalo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Mayerli Lisseth León Garófalo, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 12 de junio de 2024

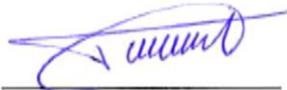
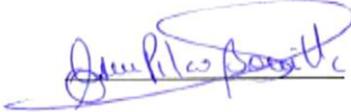


Mayerli Lisseth León Garófalo

C. I: 2350417966

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **ESTUDIO *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE TRES ESPECIES VEGETALES DE LA FAMILIA Euphorbiaceae FRENTE A UNA CEPA DE INTERÉS PERIODONTOPATOGÉNICA**, realizado por la señorita: **MAYERLI LISSETH LEÓN GARÓFALO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Bqf. Valeria Isabel Rodríguez Vinuesa PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	2024-06-12
Bqf. Gisela Alexandra Pilco Bonilla DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 _____	2024-06-12
Bqf. Aida Adriana Miranda Barros ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 _____	2024-06-12

DEDICATORIA

A mi refugio seguro, mi familia.

Mayerli

AGRADECIMIENTO

A Dios.

Mayerli

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. <i>Objetivo general</i>	3
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	3
1.3. Justificación.....	3
1.4. Pregunta de investigación.....	4

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Antecedentes de investigación.....	5
2.2. Referencias teóricas.....	5
2.2.1. <i>Salud bucodental</i>	5
2.2.1.1. <i>Cepillo dental</i>	6
2.2.1.2. <i>Limpieza interproximal: Hilo dental</i>	6
2.2.1.3. <i>Agentes quimioterapéuticos antiplaca</i>	6
2.2.2. <i>Enfermedad bucodental</i>	8
2.2.2.1. <i>Enfermedades periodontales</i>	9
2.2.3. <i>Cepas periodontales</i>	10
2.2.3.1. <i>Streptococcus mutans</i>	10
2.2.4. <i>Familia Euphorbiaceae</i>	11
2.2.4.1. <i>Higuerilla (Ricinus communis L.)</i>	11
2.2.4.2. <i>Sangre de drago (Croton lechleri Müll. Arg.)</i>	12
2.2.4.3. <i>Sacha inchi (P. volubilis L.)</i>	13

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	15
3.1.	Enfoque de investigación	15
3.2.	Nivel de la investigación	15
3.3.	Diseño de investigación	15
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	15
3.4.	Tipo de estudio	15
3.5.	Lugar de la investigación	15
3.6.	Población y selección del tamaño de la muestra	16
3.6.1.	<i>Material vegetal</i>	16
3.6.2.	<i>Material biológico</i>	16
3.7.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	17
3.7.1.	<i>Control de calidad de la droga cruda</i>	17
3.7.1.1.	<i>Evaluación macroscópica</i>	17
3.7.1.2.	<i>Determinación de humedad</i>	17
3.7.1.3.	<i>Determinación de cenizas</i>	18
3.7.2.	<i>Marcha fitoquímica (cualitativo)</i>	20
3.7.3.	<i>Tratamiento de la droga vegetal</i>	24
3.7.3.1.	<i>Extractos vegetales</i>	24
3.7.4.	<i>Preparación de las soluciones del material vegetal</i>	26
3.7.5.	<i>Difusión en disco (método Kirby-Bauer)</i>	26
3.7.5.1.	<i>Evaluación del preparado vegetal y control positivo combinados</i>	28

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	30
4.1.	Procesamiento, análisis, interpretación de resultados y discusión	30
4.1.1.	<i>Control de calidad de la droga vegetal</i>	30
4.1.1.1.	<i>Evaluación macroscópica</i>	30
4.1.1.2.	<i>Determinación de humedad</i>	31
4.1.1.3.	<i>Determinación de cenizas</i>	32
4.1.2.	<i>Marcha fitoquímica</i>	32
4.1.3.	<i>Difusión en disco (método Kirby-Bauer)</i>	34
4.1.3.1.	<i>Evaluación del preparado vegetal y control positivo combinados</i>	41

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
5.1.	Conclusiones.....	45
5.2.	Recomendaciones.....	46

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Taxonomía de <i>Ricinus communis</i> L.	11
Tabla 2-2:	Taxonomía de <i>Croton lechleri</i>	12
Tabla 2-3:	Taxonomía de <i>Plukenetia volubilis</i>	13
Tabla 3-1:	Ubicación de la recolección del material vegetal	16
Tabla 4-1:	Evaluación macroscópica de <i>R communis</i> , <i>C. lechleri</i> y <i>P. volubilis</i>	30
Tabla 4-2:	Resultados de humedad en <i>R. communis</i> , <i>C. lechleri</i> y <i>P. volubilis</i>	31
Tabla 4-3:	Cenizas totales, insolubles en ácido y solubles en agua de <i>R. communis</i> , <i>C. lechleri</i> y <i>P. volubilis</i>	32
Tabla 4-4:	Caracterización de metabolitos secundarios en extracto etéreo, etanólico y acuoso.....	33
Tabla 4-5:	Halos y porcentajes relativos de inhibición de <i>R. communis</i> y controles.....	35
Tabla 4-6:	Halos y porcentajes relativos de inhibición de <i>C. lechleri</i> y controles.....	37
Tabla 4-7:	Halos y porcentajes relativos de inhibición de <i>P. volubilis</i> y controles	39
Tabla 4-8:	Halos y porcentajes relativos de inhibición de <i>P. volubilis</i> y controles	40
Tabla 4-9:	Resultado del efecto de combinación entre clorhexidina 0,2 % y los extractos vegetales.....	42

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 3-1:	Marcha fitoquímica.	21
Ilustración 4-1:	Diagrama de barras del diámetro de disco + halo de inhibición VS las sustancias evaluadas en <i>R. communis</i> , control positivo y control negativo..	36
Ilustración 4-2:	Diagrama de barras del diámetro de disco + halo de inhibición VS las sustancias evaluadas en <i>C. lechleri</i> , control positivo y control negativo.	38
Ilustración 4-3:	Diagrama de barras del diámetro de disco + halo de inhibición VS las sustancias evaluadas en <i>P. volubilis</i> control positivo y control negativo.	40
Ilustración 4-4:	Diagrama de barras de los diámetros de inhibición de las soluciones combinadas, control positivo y negativo.	43

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN O ADQUISICIÓN DE

ANEXO B: CONTROL DE CALIDAD DE *R. communis*, *C. lechleri* Y *P. volubilis*.

ANEXO C: MARCHA FITOQUÍMICA DE *R. communis*, *C. lechleri* Y *P. volubilis*.

ANEXO D: RESULTADOS DE DIFUSIÓN EN DISCO Y COMBINACIONES.

ANEXO E: AUTORIZACIÓN DE RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES DE ESPECIES
VEGETALES

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de tres especies vegetales de la familia Euphorbiaceae frente a una cepa de interés periodontopatogénica. Las especies seleccionadas fueron *Ricinus communis* L (hojas), *Croton lechleri* Müll. Arg. (látex) *Plukenetia volubilis* L (hojas), recolectadas en distintas áreas del país. Para lo cual, se realizó tamizaje fitoquímico para determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes. Posteriormente, se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, de forma individual como dilución y su combinación con clorhexidina mediante el método de difusión en disco frente a *Streptococcus mutans*. Los resultados indicaron la presencia de terpenos en el extracto etanólico de *R. communis*, mientras que los compuestos fenólicos se encontraron, tanto en el extracto acuoso de *C. lechleri*, como en el extracto etanólico de *P. volubilis*. Se hace énfasis en estos compuestos, debido a que se les atribuye el efecto antibacteriano en los extractos crudos de *C. lechleri* y de *P. volubilis* a concentraciones de 12516 mg/L y 168300 mg/L, respectivamente. En el caso de las combinaciones, se observó una disminución del efecto debido a una posible interacción antagónica entre los componentes vegetales y el antibiótico. En consecuencia, se concluye que *C. lechleri* y *P. volubilis* presentan actividad contra la bacteria estudiada. Se recomienda a futuras investigaciones, el aislamiento de los metabolitos secundarios responsables de esta actividad, lo que podría ofrecer nuevas perspectivas para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.

Palabras clave: <ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA> <EXTRACTOS VEGETALES> <HIGUERILLA (*Ricinus communis*)> <SANGRE DE DRAGO (*Croton lechleri*)> <SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*)> <DIFUSIÓN EN DISCO> <TAMIZAJE FITOQUÍMICO>.

0824-DBRA-UPT-2024



ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the in vitro antibacterial activity of three plant species from the Euphorbiaceae family against a periodontopathogenic strain of interest. The selected species were *Ricinus communis* L (leaves), *Croton lechleri* Müll. Arg. (latex), and *Plukenetia volubilis* L (leaves), collected from different areas of the country. For this, phytochemical screening was performed to qualitatively determine the secondary metabolites present. Subsequently, the antibacterial activity of the plant extracts was evaluated individually as a dilution and in combination with chlorhexidine using the disk diffusion method against *Streptococcus mutans*. The results indicated the presence of terpenes in the ethanolic extract of *R. communis*, while phenolic compounds were found in both the aqueous extract of *C. lechleri* and the ethanolic extract of *P. volubilis*. Emphasis is placed on these compounds because they are attributed to the antibacterial effect in the crude extracts of *C. lechleri* and *P. volubilis* at concentrations of 12516 mg/L and 168300 mg/L respectively. In the case of combinations, a reduction in the effect was observed due to a possible antagonistic interaction between the plant components and the antibiotic. Consequently, it is concluded that *C. lechleri* and *P. volubilis* exhibit activity against the studied bacteria. It is recommended for future research to isolate the secondary metabolites responsible for this activity, which could offer new perspectives for the development of new antibacterial agents.

Keywords: <ANTIBACTERIAL ACTIVITY> <PLANT EXTRACTS> <CASTOR BEAN (*Ricinus communis*)> <DRAGON'S BLOOD (*Croton lechleri*)> <SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*)> <DISK DIFFUSION> <PHYTOCHEMICAL SCREENING>.



Ing. Romel Francisco Calles Jiménez

0603877713

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales son aquellas afecciones caracterizadas por procesos inflamatorios a nivel de encía y/o periodonto, en respuesta a diversos factores. Un esfuerzo significativo de los hallazgos, demuestran que ocurre principalmente por disbiosis bacteriana (y en su minoría por levaduras y virus) de la cavidad oral, además de, factores ambientales o genéticos ligados específicamente al huésped (Bessa et al., 2022), considerándose una patología común.

El análisis de los datos demuestra que el 80 % de la población mundial, a lo largo de la vida, ha experimentado enfermedades periodontales, siendo, la gingivitis la forma leve y habitual que se presenta de forma asintomática en etapas iniciales y en etapas más avanzadas se frecuentan los sangrados, sensibilidad, halitosis y dolor (Gasner y Schure 2022). Solo un reducido porcentaje, entre el 10 % y 15 % de la población, evolucionan a un estadio más severo, denominándose periodontitis (proceso irreversible) (Shaju, 2012).

Si evoluciona sin tratamiento, compromete la calidad de vida, estética y masticación del paciente (Nazir et al., 2020). Por ello, con la primera línea del tratamiento encaminado al campo farmacológico, además de los procedimientos mecánicos e higiénicos, se busca erradicar o detener los depósitos de carga bacteriana (localizados en el surco gingival), consecuentemente, reduce la respuesta inflamatoria (Gasner y Schure, 2022).

La evidencia ha sugerido en las últimas décadas, el desarrollo de nuevos enfoques, tanto profilácticos como dirigido al tratamiento, mediante la búsqueda de combinaciones de ingredientes farmacéuticos activos (API, por sus siglas en inglés), reutilización independiente de APIs ya estudiados, descubrimiento de nuevos APIs sintéticos, semisintéticos o derivados naturales, etc. que demuestren eficacia y seguridad. Con ello, surge el interés de impulsar esta nueva perspectiva de investigación en agentes terapéuticos basados en la estructura de metabolitos secundarios bioactivos de especies vegetales.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

En Ecuador, las enfermedades orales constituyen un problema de salud pública y la higiene oral inadecuada es el factor principal, asociándose a la falta de conocimiento y/o al nivel socioeconómico. Sin embargo, existen otros factores de riesgos individuales que también conducen al deterioro de la salud bucal, y en consecuencia a enfermedades periodontales. Estos factores modificables incluyen el consumo frecuente de cigarrillo, alcohol, azúcar y no modificables como la edad, embarazo, diabetes mellitus, u otros trastornos genéticos del paciente (Gasner y Schure, 2022).

Según datos epidemiológicos de 2019 realizado por NARANJO, la gingivitis es la enfermedad oral más común en el país donde el 74 % de la población escolar lo presenta. La gingivitis es responsable de la acumulación y desequilibrio armónico del consorcio bacteriano, avanzando a la inflamación crónica de tejido y huesos subyacentes en respuesta a toxinas liberadas por los patógenos, posterior progresa a periodontitis si no recibe tratamiento previo. Si la situación no mejora, conduce a la pérdida del hueso alveolar y finaliza en la pérdida de dientes afectados (Gasner y Schure, 2022).

Uno de los principales patógenos orales involucrados en formas severas de enfermedades periodontales corresponde a *Streptococcus mutans*, localizado en placa subgingival (Contardo et al., 2011). Su factor de patogenicidad se relaciona con la capacidad de adherirse al esmalte del diente promoviendo biofilms de capas gruesas, producción de ácidos orgánicos y resistencia a pH ácidos; lo que prolonga la duración de la enfermedad, con la posibilidad de evolucionar a infecciones sistémicas (Buonavoglia et al., 2022).

El desafío que se enfrenta la medicina dental se relaciona con la escasez de recursos y la resistencia bacteriana. La disponibilidad limitada de recursos profilácticos y de tratamiento en el mercado, se debe a una serie de efectos secundarios. Además, se suma un nuevo escenario correspondiente a la aparición de genes de resistencia que aumenta la patogenicidad de la especie, lo cual indica menor eficacia en el abordaje del problema de salud. Estos escenarios representan un reto a futuro para la salud bucal (Bessa et al., 2022).

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivo general*

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de tres especies vegetales de la familia Euphorbiaceae frente a una cepa de interés periodontopatogénica.

1.2.2. *Objetivos específicos*

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *R. communis* L., látex de *C. lechleri* Müll. Arg. y las hojas de *P. volubilis* L., a través del tamizaje fitoquímico.
- Determinar el halo de inhibición que cada una de las especies vegetales de interés presenta frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Evaluar la actividad antibacteriana producto de la combinación entre la dilución con mayor halo y un antibiótico.

1.3. Justificación

Los recursos destinados a la profilaxis y el tratamiento enfocados en la salud oral tienen por objeto reducir de forma significativa la acumulación de biopelículas dentales con la incorporación de tres elementos esenciales en la rutina diaria. Estos elementos incluyen el cepillo dental, hilo dental (destinado para limpieza interproximal) y agentes quimioterapéuticos antiplaca presentes en distintas formas como enjuagues bucales, pastas, geles, barnices dentales, etc. Además, se recomienda visita frecuente al especialista (Gasner y Schure 2022).

Se conoce que en el mercado existen pocas opciones como agentes quimioterapéuticos antiplacas y antimicrobianas. La ejemplar clorhexidina, es considerada como el estándar de oro, el cual ha demostrado su eficacia en el tratamiento de los biofilms (Cieplik et al., 2019). No obstante, este agente ha sido objeto de creciente atención por los controvertidos efectos adversos y su asociación con aparición de resistencia bacteriana. Por lo que, la investigación investigativa se dirige al hallazgo de nuevos agentes antibacterianos, entre ellos derivados de especies vegetales para la implementación de formulaciones bucales futuras.

La familia Euphorbiaceae presenta una amplia variedad de especies con actividad antibacteriana, se atribuye su efecto a los compuestos fitoquímicos, que incluyen a terpenoides, derivados fenólicos, alcaloides, ácidos grasos, etc. Por ejemplo, se destaca las hojas de higuerilla, ricas en flavonoides, tales como quercetina, rutina y kaempferoles; taninos, fenoles, esteroides y terpenos.

También, el látex de sangre de drago, el cual contiene compuestos diterpénicos tales como las koberinas (A y B) y el ácido crolecínico. Finalmente, las hojas de sachá inchi, poseen alto contenido fenólico y flavonoides; responsables de la acción biológica (Jones, 2003; Chirinos et al., 2016; Polania et al., 2021).

1.4. Pregunta de investigación

¿Los extractos de las hojas de *R. communis* L., látex de *C. lechleri* Müll Arg. y las hojas de *P. volubilis* presentan actividad antibacteriana frente a *S. mutans*?

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

La familia Euphorbiaceae, que comprende más de 300 géneros reconocidos, ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional por su eficacia en el tratamiento de enfermedades. Los estudios de *Ricinus communis* por LEITE et al., en los años 2014 – 2019 en Brasil se centró en investigar la capacidad inhibitoria del aceite extraído de las semillas a concentraciones de 2 %, 5 % y 10 % en dentífricos experimentales obteniendo 0,0781 % de concentración inhibitoria mínima (CMI) en bacterias gram positivas y nula efectividad en levaduras.

Otra especie de amplio uso tradicional es *Croton lechleri*. Las investigaciones de Lazo y Pareja en el año 2007 (Perú) demostraron efectividad *in vivo* en mujeres embarazadas con diagnóstico positivo de enfermedades periodontales obteniendo ausencia de edema gingival, sangrado gingival, enrojecimiento de la encía, placa bacteriana y la transición del estado clínico severo a leve al trigésimo día de aplicación. Estudios independientes realizados por Cayo y Barrera (2014); Avilés et al., (2018) y Guevara (2020) corroboran actividad antibacteriana *in vitro* en cepas periodontopatogénicas refiriendo que las concentraciones al 75 % y 100 % presentan mayor halo de inhibición.

Finalmente, la especie *Plukenetia volubilis* ha sido insuficientemente estudiada en términos de propiedades farmacológicas. No obstante, existe información que respalda la presencia de metabolitos secundarios en semillas, del cual el 93,1 % corresponde a taninos condensados y su fracción restante a ácidos fenólicos libres y ligados, taninos hidrolizables y flavonoides (Chirinos et al., 2016). En 2020, Jang, You, Kim realizan el análisis en hojas, identificando flavonoides (466,38 mg/kg de extracto), fenoles ($97,84 \pm 2.25$ mg/g QUE), alcaloides (146 ± 7 mg/kg de muestra), saponinas, fitoesteroles, taninos, lectinas (0,20 ng/kg de muestra) y carotenoides (0,07 mg/kg de muestra). Estos hallazgos resultan de interés para los investigadores, ya que se conoce que los flavonoides y compuestos fenólicos poseen actividad antibacteriana relevante.

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. Salud bucodental

La definición de “salud bucal” es polifacética según la perspectiva de las organizaciones, no obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera como la puerta de entrada a la

salud y bienestar general (físico, psicológico y social) manteniendo una visión hacia la funcionalidad correcta de boca, dientes y estructuras orofaciales, y no exclusivamente a la ausencia de inflamaciones, infecciones, pérdidas de piezas dentales, etc. (who, s.f.).

Para mantener y asegurar una mejor calidad de vida, y en conjunto salud dental integral, los hábitos de higiene oral debe ser parte del estilo de vida en los individuos. Entre los hábitos indispensables se citan a tres: uso del cepillo de dientes, hilo dental y agentes quimioterapéuticos para control de placa (lavado bucal (mediante enjuagues) y lubricantes dentales (mediante agentes humectantes)). El principal objetivo de estas medidas de limpieza es la eliminación de placas dentales, evitando a futuro que espese y madure (sarro), de lo contrario la disbiosis puede incluir a especies bacterianas complejas como bacterias anaerobias gram negativas, bacilos gram negativos e inclusive bacterias resistentes (Eden, 2008).

2.2.1.1. Cepillo dental

Es el primer dispositivo que se empleó para la limpieza bucal. El cepillo dental es una herramienta, que a través de sus cerdas suaves retira restos de alimentos, reduce el número de patógenos en la superficie de las piezas dentales y disminuye el riesgo de enfermedades bucodentales (Eden, 2008). La técnica correcta del dispositivo consiste en usar bidirario, mínimo dos minutos, acompañado de un dentífrico con flúor. y no inferior, ya que solo se elimina entre 40 % a 50 % de la placa. Según revisión en literatura científica, una buena técnica de cepillado previene caries en 16 % por diente y 31 % en superficie (Santos, Oliveira y Nadanovsky, 2013).

2.2.1.2. Limpieza interproximal: Hilo dental

Para la limpieza mecánica interdental existen herramientas como hilo dental, cepillos interdentales y cuñas de madera. El primer ejemplar es el más común para el área susceptible de las enfermedades periodontales, elaborado a partir de nailon o politetrafluoroetileno (Hughes y Dean, 2016). Consiste en un hilo de cera, seda u otro material con grosor variable que alcanza dientes pilares, usado para 10 movimientos por cada diente, logrando la eliminación de placa adherida en la superficie y restricción de inflamación gingival (Eden, 2008).

2.2.1.3. Agentes quimioterapéuticos antiplaca

En el mercado existen formulaciones en diversas presentaciones que contienen agentes antisépticos probados clínicamente para prevención y eliminación de placas microbianas, generalmente con amplio espectro. Entre estas formas farmacéuticas se enlistan a enjuagues

bucales (tensioactivos), dentífricos, geles, apósitos periodontales, lubricantes, etc. que dependiendo del agente químico presente en la formulación se clasifican por generación (Vyas et al., 2021).

Estos agentes quimioterapéuticos (AQ) se clasifican en: AQ de primera generación con efectividad antiplaca entre 20 % al 50 % y tienen duración de 4 a 6 horas; AQ de segunda generación con mayor retención (a diferencia del resto de generaciones) en tejido oral eliminando hasta un 90 % de población patógena y posee duración de 12 horas o más; y AQ de tercera generación, con menor capacidad de retención a diferencia a la segunda generación (Vyas et al., 2021).

Antisépticos bisguanídicos: Clorhexidina (CHX)

Es un compuesto de naturaleza bisbiguanida antibacteriano que puede actuar como bacteriostático o bactericida dependiendo de la concentración, denominado como “estándar de oro” por la acción antimicrobiana prolongada y el amplio espectro. Los estudios demuestran tener mayor eficacia en especies bacterianas de tipo gram positivas que en gram negativas, y en menor relación en virus, hongos (como fungicida y fungistática) y nulo contra esporas resistentes al calor (Vranic et al., 2004).

Este agente químico antiplaca pertenece a la segunda generación, por lo que la retención dura hasta 24 horas desde su aplicación fijándose en la cavidad bucal, en específico a bacterias patógenas, placa, saliva y esmalte por la presencia de los grupos cargados negativamente (fosfatos, sulfatos y carboxilos) (Vyas et al., 2021). El mecanismo de acción está basado en la atracción catiónica entre la CHX (carga positiva) y la pared celular bacteriana, posterior surge la adsorción a componentes proteínicos fosfatados en la superficie (Poppolo y Ouanounou, 2022).

A concentraciones mínimas inhibitorias tiene efecto bacteriostático (reversible), generando la alteración de la pared y membrana celular, como consecuencia provoca fuga de componentes citoplasmáticos (entre ellos iones de potasio e inactivación de enzimas) (Poppolo y Ouanounou, 2022), en contraste, a altas concentraciones tiene efecto como coagulante citoplasmático y forma precipitados irreversibles con el trifosfato de adenosina (ATP) y los ácidos nucleicos una vez dañado la membrana citoplasmática (Lim y Kam, 2008).

Según estudios realizados muestra efectividad cuando es usado como profiláctico o con fines terapéuticos, a concentraciones máximas de 0,2 % CHX con 10 mL de aplicación, dos veces al día durante dos semanas (a corto plazo). A concentraciones inferiores de 0,1 %, existe evidencia contraste en eficacia, por lo que no es recomendable su uso. Los efectos secundarios tienen lugar incluso a concentraciones de 0,06 %, entre los comunes indican tinción dental, alteración del

gusto, decoloración de lengua, formación de cálculos salivales, entumecimiento de lengua y boca, sequedad en boca (xerostomía) e hipogeusia. Mientras que, los pocos comunes incluyen parestesia oral, hinchazón de la glándula parótida, descamación de la mucosa oral y glosodinia (Poppolo y Ouanounou, 2022).

Otro punto desfavorecido de la CHX es la resistencia demostrada en bacterias y hongos orales. Los hallazgos surgen una década después de su uso en la práctica odontológica en 1970, concluyendo que en cepas de *S. mitis*, *Capnocytophaga* spp., *P. gingivalis*, *S. gordonii*, *F nucleatum*, *Candida* spp., etc. demostraron cambios genéticos, incremento significativo de concentraciones mínimas inhibitorias, reducida actividad metabólica y menos susceptibilidad en uso prolongado de CHX (Cieplik et al., 2019).

El mecanismo de acción en respuesta a la resistencia se debe a una acción intrínseca, es decir las cepas son capaces de formar una barrera protectora e impermeabilidad en la membrana celular cuando están expuestas a moléculas de CHX, gracias a la regulación positiva de las bombas de eflujo que eliminan las sustancias tóxicas en los canales formados en la membrana. Estas bombas pueden dar origen resistencia cruzada con múltiples fármacos. Por lo que, se destaca mayor vigilancia en bacterias multirresistentes presentes en la placa (Cieplik et al., 2019).

2.2.2. Enfermedad bucodental

El tabaquismo, ingesta de alcohol, dieta no balanceada, inadecuada practicidad en higiene bucal, polimorfismos genéticos y/o bajos recursos económicos, son aquellos factores de riesgo que inician una brecha de enfermedad, causando desequilibrio armónico de la salud y bienestar (Tadin et al., 2022). Las enfermedades bucodentales engloban una gran lista de afecciones, tales como, caries (impacta prácticamente a la totalidad de la población), gingivitis, periodontitis o piorrea, halitosis, herpes labial, aftas bucales, leucoplaquia, edentulismo, cáncer oral, noma, traumatismo orodental e incluso defectos congénitos (Who, s.f.).

Las cifras actualizadas de la OMS del 2019 demuestran que la carga de las enfermedades bucodentales es de 3.500 millones de personas distribuidas a nivel mundial, cifra que aumentará por el crecimiento demográfico y envejecimiento. En específico, las caries dentales afectan a 2.500 millones de personas, la periodontitis a 1.000 millones de personas y la pérdida de las piezas dentales a 350 millones de personas. Entre la población más desfavorecida y con mayor demanda corresponde a países de ingresos bajos, medios y de situaciones vulnerables afectando a tres de cada cuatro personas (Who, s.f.). Esto representa una asociación negativa con cambios sociales, comerciales y económicos, mediante la progresión en atención dental (Pérez et al. 2019). A pesar de

ser en su mayoría enfermedades no transmisibles representa un bloqueo costoso figurando el 4.8 % del gasto sanitario directo mundial.

2.2.2.1. *Enfermedades periodontales*

Las enfermedades periodontales abordan dos afecciones, la etapa inicial limitada en la encía, denominada gingivitis y aquella que se extiende a tejidos más profundos llamada periodontitis, ambos causados por bacterias (u otros patógenos) de la placa dental, es decir un depósito de especies patógenas en dientes y encía que logran colonizar por desequilibrio de la microflora oral (Bascones y Figuero, 2005). En la literatura se enlistan a más de 300 patógenos responsables de la destrucción periodontal, predominando bacterias anaeróbicas gram negativas como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivales*, que son las formas más agresivas y en minoría bacterias gram positivas que contribuyen en la fase inicial como los *Streptococcus* spp. (Kinane, Stathopoulou & Papapanou, 2017).

Gingivitis

Es la afección más común denotada por inflamación del tejido gingival o encía y la unión del tejido conectivo al diente (Rathee y Jain, 2023). Esta enfermedad tiene varios tipos en función a su etiología, la más frecuente es causada por placas dentales denominada como gingivitis eruptiva. No obstante, también se han identificado variantes de gingivitis de origen nutricional (déficit de vitamina C), hormonal (alteración de niveles de estrógeno) e inducida por medicamentos (efectos secundarios de fenitoína, anticoagulantes, anticonceptivos orales, etc.) (Rathee y Jain, 2023).

A los cuatro días de acumulación de placa, comienza la etapa “lesión inicial” de la enfermedad donde se genera respuesta inflamatoria exudativa, se genera líquido y hay una destrucción de colágeno por la migración de neutrófilos. Posterior en “lesión precoz” aparecen respuestas clínicas comunes como hinchazón, enrojecimiento y sangrado de la zona afectada, además existe alteración de células inflamatorias predominando los linfocitos. La etapa avanza a “lesión establecida” donde se genera un bolsillo gingival, disminuye células T y prevalecen células B. Finalmente, la “lesión avanzada” que es un paso previo a la periodontitis, en esta etapa la lesión avanza al tejido conectivo y tejido mineralizado (Rathee y Jain, 2023).

El tratamiento de la enfermedad tiene como objetivo la reducción de la inflamación en conjunto con la eliminación de los depósitos de placa que se logra con un protocolo de higiene bucal básico, que incluye cepillado de dientes, limpieza interproximal y la adición de un AQ antiplaca (ej. enjuague bucal a base de gluconato de clorhexidina 0,2 %). Asimismo, una alternativa profesional es la limpieza mecánica (Rathee y Jain, 2023).

Periodontitis

Del término periodontitis se derivan dos léxicos, “periodonto-“ que significa organización compleja que rodea los dientes e “itis” que representa inflamación, es decir que la periodontitis refiere a la inflamación y destrucción en estructuras que soportan los dientes, como la encía, ligamento periodontal, cemento dental y hueso alveolar. Goudouri, Kontonasaki, Boccaccini, 2017). Esta enfermedad se origina a partir de la gingivitis (no en todos los casos) cuando no aborda con tratamiento en la “lesión establecida” (Rathee y Jain, 2023).

El cambio de gingivitis a periodontitis se manifiesta con la propagación de inflamación hasta llegar al ligamento periodontal que conduce a la pérdida de inserción, es decir, destrucción de fibras de colágeno por enzimas secretadas por neutrófilos y activación de células osteoclastos, que provoca edentulismo y deterioro de la función masticatoria (Mehrotra y Singh, 2023). Además, esta afección se caracteriza por halitosis (Arigbede, Babatope y Bamidele, 2012).

Pese a ser un proceso irreversible es posible el manejo de periodontitis. El tratamiento puede tomar dos direcciones, el primero se centra en mejorar la salud gingival con hábitos de higiene bucal básicos, además de terapia mecánica, como raspado, alisado radicular y mantenimiento de AQ antiplaca. Y el segundo enfoque incluye intervención quirúrgica como gingivectomía, colgajo de reposición apical, injertos de tejido blando, injerto óseo, entre otras técnicas (Matos & Bascones, 2011).

2.2.3. Cepas periodontales

2.2.3.1. *Streptococcus mutans*

Es una bacteria anaeróbica facultativa gram positiva involucrada en enfermedades bucodentales, tales como caries y enfermedades periodontales. Habita principalmente en placas dentales y en bolsas periodontales, por la capacidad de desarrollarse a bajas tensiones de oxígeno. La proliferación está estrechamente relacionada con el estrés ambiental (aciduricidad) que proporciona las condiciones necesarias para predominar en el nicho heterogéneo una vez que produce mutacinas (Lemos et al., 2019). En casos de lesiones en el sistema vascular periodontal, la bacteria migra al torrente sanguíneo ocasionando endocarditis infecciosa, siendo un riesgo potencial, concretamente a pacientes con problemas cardiovasculares y aquellos con el sistema inmune comprometidos (Buonavoglia et al., 2022).

2.2.4. Familia Euphorbiaceae

2.2.4.1. Higuera (Ricinus communis L.)

También conocida bajo las denominaciones de ricino, castor, *Palma (e) Christi*, higuera, higuera, etc. dependiendo de la zona geográfica (Worbs, et al., 2011). Es una especie eudicotiledónea, perteneciente de la familia Euphorbiaceae originaria de África, Asia y extendida en zonas tropicales y subtropicales localizándose también en el continente americano, por lo que es considerada como especie exótica invasora. Cuenta con una producción de semillas en un periodo de 10 a 15 años, siendo de interés económico por la obtención de aceite (Rivarola, et al., 2011).

Tabla 2-1: Taxonomía de *Ricinus communis* L.

JERARQUÍA TAXONÓMICA DE <i>Ricinus communis</i> L.	
Reino:	Plantae
División:	Traqueophyta
Subdivisión:	Spermatophytina
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Ricinus</i>
Especie:	<i>communis</i>
Epítelo específico	<i>Ricinus communis</i> L.

Fuente: Sistema Integrado de Información Taxonómica [ITIS], s.f.

Descripción botánica

Es un arbusto perenne de altura promedio 2,5 m, pese a ello, puede alcanzar los 6 m con multitallos blandos, leñosos y ramificados, productores de savia. Sus hojas de haz verde o rojizas, son de tipo simples, pecioladas, palmadas (hasta 11 lóbulos), alternas y dentadas. Contiene, además de inflorescencias agrupadas por flores masculinas (tonalidad amarillo verdoso) y femeninas de estigmas rojas (Bockisch, 1998). El fruto espinoso es encapsulado. Las semillas elipsoide poseen un color característico marronáceas, que en su interior contienen un grano (25 % peso total de la semilla), de característica tóxica puesta que sujeta al 1 - 5 % de glicoproteína dimérica capaz de inactivar ribosomas, llamada ricina. Su tamaño corresponde a 9 - 20 mm de largo, 6 - 15 mm de ancho y 4,5 - 9 mm de grosor (Benamor, et al., 2020).

Metabolitos secundarios

La utilidad medicinal como antifúngico, antimicrobiano, hepatoprotector, antidiabético, antioxidante, larvicida, antiinflamatorio, etc. se debe principalmente por sus fitoconstituyentes, tales como alcaloides (ricinina), esteroides, flavonoides (kaempferol-3-O-β-D-xilopiranosido, kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosido, kaempferol-3-O-β-rutinósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-β-D-xilopiranosido, quercetina y rutina), taninos, fenoles (ácido gálico,

epicatequina, ácido eláxico y ácido getístico), esteroides, terpenos, resinas y gomas (Voleti et al., 2022).

2.2.4.2. *Sangre de drago (Croton lechleri Müll. Arg.)*

Es un árbol originario de zonas montañosas orientales en América del Sur, específicamente de la amazonía ecuatoriana (15 m.s.n.m.), colombiana (100 - 600 m.s.n.m.), boliviana y peruana (1000 m.s.n.m.). Referido acorde a su vocablo como sangre de dragón, sangre de grado, sangre de madera, palo de grado y árbol de la alegría (Jones, 2003).

Tabla 2-2: Taxonomía de *Croton lechleri*

JERARQUÍA TAXONÓMICA DE <i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.	
Reino:	Plantae
División:	Traqueophyta
Subdivisión:	Spermatophytina
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Croton</i>
Especie:	<i>lechleri</i>
Epítelo específico	<i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.

Fuente: Sistema Integrado de Información Taxonómica [ITIS], s.f..

Descripción botánica

Es un árbol que alcanza hasta 15 - 20 m de altura, con hojas de 12 - 20 cm de largo y 5 - 14 cm de ancho con morfología acorazonada, de clasificación simples, en su mayoría alternadas, cuentan con 6 - 8 nervaduras paralelas; raíz cilíndrica cónica y peridermis súber o corcho; fruto capsulado; flores con una espiga alta y delgada; la corteza que lo rodea es grisácea blanquecina, alcanza un diámetro de 30 cm, presenta lenticelas y savia (látex) de color rojizo pardo; y semillas con carúncula y endospermo oleaginoso (Ramírez, 2003).

Metabolitos secundarios

C. lechleri, es una especie vegetal rica en proantocianidinas solubles (90 % peso en seco) destacando a los taninos catéquicos como (+)-catequina, (-)-epicatequinas, (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina; bincatriol, crolecínol, ácido crolecínico, ácido hardwickiico y koberinas como los principales diterpenos; y esteroides como b-sitosterol-b-D-glucopiranosido y b-sitosterol; el 9 % representa a los alcaloides como taspina, pridina, antraquinonas y aportineindol principalmente

en la savia; mientras que la fracción restante corresponde a trazas de compuestos de distinta naturaleza química (Jones, 2003).

2.2.4.3. *Sacha inchi* (*P. volubilis* L.)

El nombre común deriva de la lengua nativa quechua, compuesta por “sacha” que significa silvestre e “inchi” que significa maní. También es conocida bajo las denominaciones de maní del inca, maní del monte, sacha yuchiqui, sacha inchik, etc. El área de distribución comprende entre altitudes de 30 y 2000 m.s.n.m. al sur de la selva amazónica destacando Perú, Bolivia, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil; en climas tropicales de 10 °C a 26 °C y HR de 78 %. La planta es fácilmente identificable por su fruto en forma estelar, rica en antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados (Norma y Echeverri, 2016).

Tabla 2-3: Taxonomía de *Plukenetia volubilis*

JERARQUÍA TAXONÓMICA DE <i>Plukenetia volubilis</i>	
L.	
Reino:	Plantae
División:	Traqueophyta
Subdivisión:	Spermatophytina
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Plukenetia</i>
Especie:	<i>volubilis</i>
Epítelo específico	<i>Plukenetia volubilis</i> L.

Fuente: National Library of Medicine [NIH], s.f..

Descripción botánica

Es una planta perenne que puede alcanzar una altura de 2 metros, con hojas alternas corazonadas y bordes dentadas, de 10 cm de largo y 8 cm de ancho. Las flores contienen ambos verticilos, tanto pistiladas en la base como flores estaminadas dispuestas en racimos condensados, éste último de tamaño pequeño en color blanco. El fruto es carnoso, en estado de maduración experimenta cambio de color verde a marrón y presenta morfología estrellada con hasta ocho lóbulos. Las semillas color marrón son lenticulares de diámetro que oscila entre 1,5 cm a 2 cm (Kodahl y Sorensen, 2021; Hanssen y Schmitz, 2011).

Metabolitos secundarios

La composición de *P. volubilis* se caracteriza en mayor porcentaje por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y compuestos antioxidantes. Sin embargo, la caracterización de los

fitoconstituyentes en marcha fitoquímica de *P. volubilis* revela principalmente presencia de taninos (93,1% condensados), flavonoides, esteroides, leucoantocianidinas, alcaloides y saponinas (Castillo, Castillo y Reyes, 2010). Según la literatura, los taninos y flavonoides son responsables del debilitamiento del tejido membranoso y la inactivación de proteínas funcionales en microorganismos patógenos (Suubaar, Mosobil y Donkor, 2017).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de investigación

El presente trabajo tiene enfoque cuantitativo basado en los datos obtenidos en los halos de inhibición que presentan los extractos vegetales.

3.2. Nivel de la investigación

Es de tipo exploratorio, ya que se busca conocer la presencia o no de actividad antibacteriana de los extractos vegetales frente a *S. mutans*.

3.3. Diseño de investigación

3.3.1. *Según la manipulación o no de la variable independiente*

Diseño no experimental, debido a que no se manipulan variables deliberadamente. Sin embargo, se busca correlacionar los halos de inhibición con la presencia o ausencia de la actividad antibacteriana.

3.4. Tipo de estudio

La investigación es de tipo transaccional porque busca recolectar datos de los halos de inhibición en un solo tiempo.

3.5. Lugar de la investigación

La investigación se ejecutó en los laboratorios de Productos Naturales, Bromatología y Microbiología Clínica ubicados en la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba – Chimborazo.

3.6. Población y selección del tamaño de la muestra

3.6.1. Material vegetal

La población de estudio comprendió en las partes foliares de *R. communis* L y *P. volubilis* L, y el látex comercial de *C. lechleri* Müll. Arg. La recolección de los materiales vegetales se realizó en las siguientes ubicaciones:

Tabla 3-1: Ubicación de la recolección del material vegetal

	<i>R. communis</i>	<i>C lechleri</i>	<i>P. volubilis</i>
Provincia	Guayas	Francisco de Orellana	Santo Domingo de los Tsáchilas
Área recolectada	El Rosario, recinto San Andrés.	El Coca, comunidad Arenillas.	Santo Domingo, sector Chigiülpe
Coordenadas	-1.1126790, -79.8161950	-0.4460860334 5623365, -76.9172260 7389134	-0.271415, -79.130064

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Para ello, se utilizó muestreo aleatorio simple recolectando aproximadamente 1000 g o mL de cada especie vegetal, según corresponda. Además, se consideró los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión:

Especies vegetales en buen estado físico, es decir, aquellas con superficies integrales en las partes foliares. Además, se consideró aquellas en estado de productividad (a partir de 8 meses de siembra) para *R. communis* y *P. volubilis*. Para el látex de *C. lechleri* se consideró que el envase comercial presente buen aspecto viscoso, color rojo pardo y que haya sido recientemente envasado.

- Criterios de exclusión:

Ejemplares vegetales que presentaron daños por acción de animales o insectos, deterioro por agua, viento, estado de descomposición o con posible contaminación microbiológica.

3.6.2. Material biológico

Se empleó la cepa *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ adquirida por el Distribuidor de insumos MEDIBAC Inc.

3.7. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.7.1. Control de calidad de la droga cruda

3.7.1.1. Evaluación macroscópica

La evaluación macroscópica tiene la finalidad de identificar la especie vegetal de acuerdo con la clasificación morfológica (Kuklinski, 1999). Para la evaluación de los especímenes recolectados se consideró:

A. Hojas

1. Forma
2. Tamaño: largo y ancho
3. Textura
4. Superficie
5. Color
6. Olor
7. Condición: fresca, seca, etc.

B. Otros: látex

1. Color
2. Olor
3. Aspecto
4. Sabor
5. pH (Miranda 2002)

3.7.1.2. Determinación de humedad

El método tiene la finalidad de determinar el contenido de agua residual. Si el contenido supera el 14 % de su peso, se establece una correlación proporcional con la presencia de microorganismos no deseables, desarrollo de deterioro e hidrólisis de metabolitos secundarios activos. Para el análisis, se puede emplear cortes enteros, troceados o en polvo (material desecado) (Who Geneva, 1998).

Materiales y equipos:

- Material vegetal
- Balanza de determinación de humedad

El método empleado para esta investigación corresponde a:

A. Pérdida por humedad en termobalanza

1. Se colocó 3 g de la muestra distribuyendo uniformemente en el platillo de la balanza.
2. Se ajustó a temperatura de 105 °C y se procedió al cierre del equipo.
3. Esperado el tiempo, se realizó la lectura proporcionada en la pantalla digital del equipo expresado en.

% M – porcentaje de pérdida de masa (Ileleji et al., 2010)

3.7.1.3. Determinación de cenizas

Las cenizas corresponden al residuo inorgánico o mineral, producto de ignición u oxidación de la materia orgánica analizada. El fundamento del método consiste en valorar la pureza y calidad del material vegetal. Se determina principalmente por tres métodos que miden cenizas totales, insolubles en ácido e insolubles en agua. Las cenizas totales abarcan el residuo de ceniza fisiológica (restos vegetales) y no fisiológica (materia extraña, ej. arena y tierra). Las cenizas insolubles en ácido representan la cantidad en porcentaje de sílice en materia extraña. Finalmente, las cenizas solubles en agua indican presencia de metales pesados (WHO Geneva, 1998).

Materiales y equipos:

- Agua destilada
- Ácido clorhídrico 10 %
- Nitrato de plata 0,1 mol/L
- Reverbero
- Crisoles de porcelana
- Pinzas para crisol
- Papel filtro
- Balanza analítica
- Termobalanza
- Sorbona

Los métodos basados para esta investigación son establecidos por MIRANDA (2002) y World Health Organization [WHO] Geneva (1998):

A. Cenizas totales

1. Se colocó 3 g del material vegetal secado en crisol tarado.
2. Se calentó la porción de ensayo empleando reverbero y sorbona hasta carbonizar. Es decir, hasta obtener la ausencia de humo y color negro en muestra.

- Transferir el crisol con su contenido en horno mufla a 550 °C durante dos horas, para incineración hasta el blanco hasta peso constante.
- Se colocó en desecador para enfriar durante 30 minutos.
- Se registró el porcentaje de cenizas totales (%C_T) obtenida mediante la fórmula:

$$\%C_T = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

%C_T = porcentaje de cenizas totales

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

B. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico (en base hidratada)

- A las cenizas obtenidas en el método A. *Cenizas totales*, se añadió 2 mL de ácido clorhídrico 10 % y se cubrió con vidrio reloj.
- Se llevó a hervir por 10 minutos.
- Se enjuagó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y fue añadido al contenido del crisol.
- Se recogió las cenizas empleando papel filtro y se lavó con agua destilada caliente.
- Se colocó dos gotas de nitrato de plata 0,1 mol/L hasta que el filtrado sea neutro.
- Se trasladó el contenido con el papel filtro al crisol y fue llevado a desecar de 100 a 105 °C.
- Se incineró en mufla a temperatura de 700 – 750 °C durante dos horas, hasta peso constante.
- Se colocó en desecador hasta enfriar durante 30 minutos.
- Se registró el porcentaje de cenizas insolubles en ácido (%C_{ac}) obtenida mediante la fórmula:

$$\%C_{ac} = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

%C_{ac} = porcentaje de cenizas insolubles en ácido en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

C. Cenizas solubles en agua

- A las cenizas obtenidas en el método A. *Cenizas totales*, se añadió 15 mL de agua destilada y se cubrió con vidrio reloj.
- Se llevó al reverbero por 5 minutos.

3. Se recogió las cenizas empleando papel filtro.
4. Se trasladó el contenido con el papel filtro al crisol.
5. Posterior, se llevó a carbonizar a temperatura inferior a 450 °C e incinerar en mufla a 700 – 750 °C durante dos horas, hasta peso constante.
6. Se colocó en desecador hasta enfriar durante 30 minutos.
7. Se registró el porcentaje de cenizas hidrosolubles (%C_{ag}) obtenida mediante la fórmula:

$$\%C_{ag} = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

%C_{ag} = porcentaje de cenizas hidrosolubles

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g)

M_a = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

3.7.2. *Marcha fitoquímica (cualitativo)*

Es un ensayo preliminar de forma secuencial que emplea la técnica de “screening” o tamizaje, es decir, reacciones químicas que permiten caracterizar los metabolitos secundarios o compuestos bioactivos (fenoles, taninos, saponinas, flavonoides, etc.) basados en precipitación, viraje de color, formación de espuma, desprendimientos gaseosos, entre otros. En caso de obtener resultado negativo, este denota ausencia del compuesto de interés (Miranda, 2002).

Materiales y equipos:

- Agua destilada
- Éter etílico
- Etanol 70 % v/v
- Reactivos del tamizaje
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Reverbero
- Sorbona
- Baño de agua

El método de esta investigación sigue el esquema de extracción sucesiva de Miranda (2002), como se describe en la Ilustración 3-1:

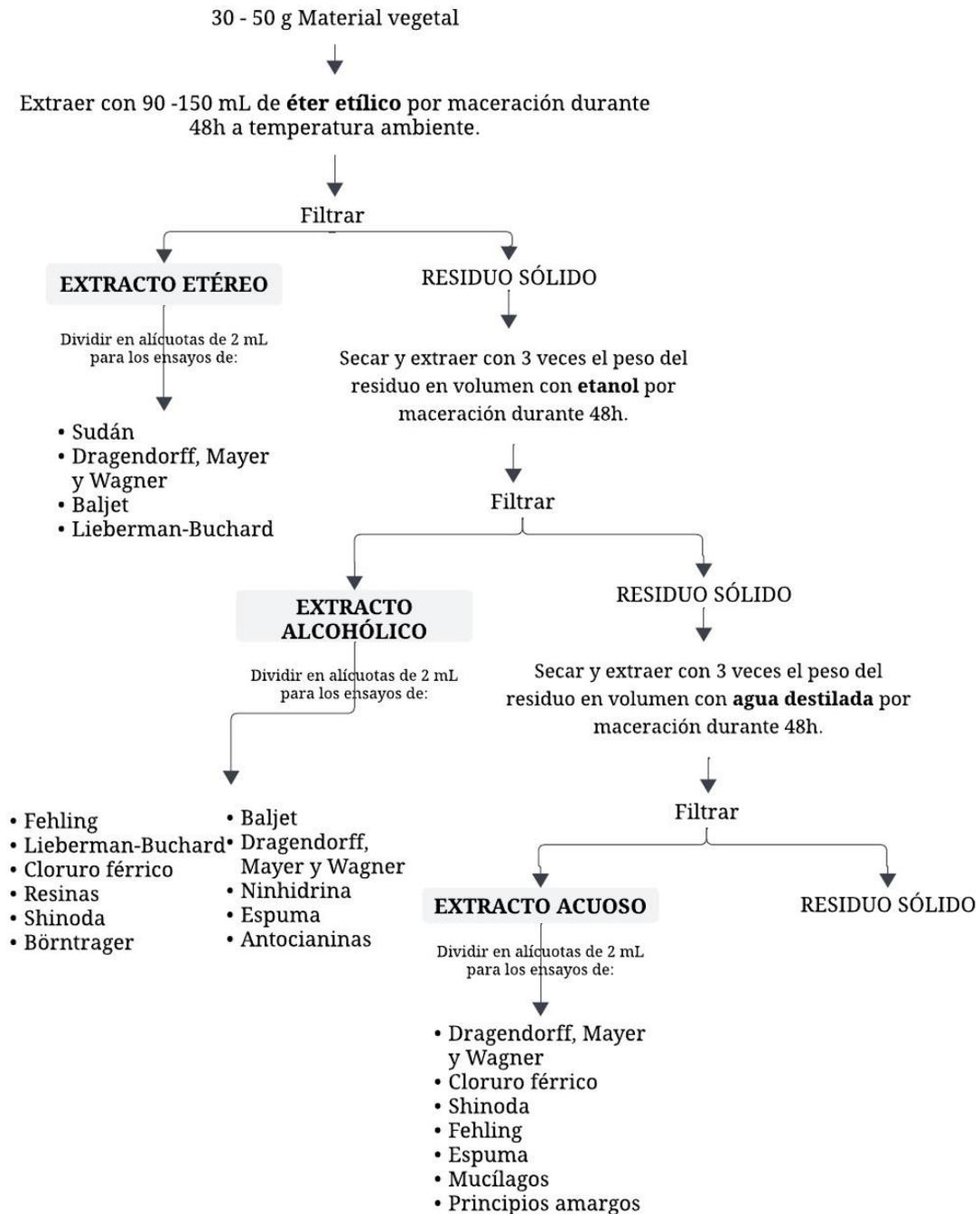


Ilustración 3-1: Marcha fitoquímica.

Fuente: Miranda M., 2002.

ENSAYO DE SUDAN: permite detectar compuestos grasos.

- A la alícuota correspondiente, se añadió 1 mL de colorante Sudan III o Sudan IV.
- Se colocó en baño de agua hasta conseguir la evaporación del solvente.

La presencia de coloración rojiza indica resultado positivo “+”.

ENSAYO DE DRAGENDORFF, MAYER Y WAGNER: permiten detectar la presencia de alcaloides por su carácter nitrogenado en el anillo heterocíclico.

- A la alícuota correspondiente, se evaporó el solvente a baño de agua.
- Los extractos con éter y etanol, se redisolvió con 1 mL de ácido clorhídrico 1 % v/v. Para el acuoso, se agregó 1 gota de ácido clorhídrico conc., se calentó y se dejó enfriar.
- A la muestra de Mayer, se añadió cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró.
- Finalmente, se añadió 3 gotas de cada reactivo en los tubos correspondientes.

La presencia de los siguientes aspectos es considerada como positivo: coloración blanquecina “+”, turbidez definida “++” o precipitado rojizo – anaranjado “+++”

ENSAYO DE BALJET: caracteriza coumarinas.

- A la alícuota correspondiente, se evaporó el solvente a baño de agua.
- Se redisolvió en 1 mL de alcohol.
- Se añadió 1 mL de reactivo Baljet.

La presencia de precipitado rojo es considerado positivo, y según se intensidad se categoriza en “+”, “++” y “+++”.

ENSAYO DE LIEBERMANN-BUCHARD: empleado para identificar cualitativamente a triterpenos y/o esteroides, dado a una protonización.

- A la alícuota correspondiente, se adicionó 1 mL de anhídrido acético.
- Posterior, se agregó 3 gotas de ácido sulfúrico conc. por las paredes del tubo.

La presencia de coloración verde – azulado es considerado positivo “+”.

ENSAYO DE FEHLING: permite identificar a carbohidratos reductores.

- A la alícuota correspondiente, se evaporó el solvente a baño de agua.
- Se redisolvió en 1 mL de agua destilada.
- Se adicionó 3 gotas de cada reactivo (solución A y B).
- Se calentó durante 10 minutos.

La presencia de coloración rojiza indica resultado positivo “+”.

ENSAYO DE CLORURO FÉRRICO: permite identificar fenoles y taninos.

- A la alícuota correspondiente, se adicionó 3 gotas de cloruro de hierro (III) 5 %. Para el extracto acuoso, se agregó acetato de sodio para neutralizar.

La presencia de coloración de verde o azul indica taninos y rojiza – vino para fenoles, indicando positivo “+”.

ENSAYO DE BÖRNTRAGER: reconoce a quinonas, debido a la oxidación de antronas y antranoles en antraquinonas.

- A la alícuota correspondiente, se evaporó el solvente en baño de agua.
- Se redisolvió en 1 mL de cloroformo.
- Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio 5 % v/v.
- Se agitó hasta mezclar las fases.
- Reposó hasta su posterior separación.

La presencia de complejos rojizos indica positivo “+”.

ENSAYO DE RESINAS

- A la alícuota correspondiente, se adicionó 10 mL de agua destilada.

La presencia de precipitado indica positivo “+”.

ENSAYO DE ANTOCIANINAS: identifica a flavonoides con estructuras C₆-C₃-C₆.

- A la alícuota correspondiente, se calentó durante 10 minutos con 1 mL de ácido clorhídrico conc, y se dejó enfriar.
- Se adicionó 1 mL de agua destilada, posterior 2 mL de alcohol amílico.
- Se agitó hasta la separación de fases.

La presencia de la tonalidad rojiza - marrón en la fase amílica indica positivo “+”.

ENSAYO DE ESPUMA: permite identificar saponinas.

- A la alícuota correspondiente, se diluyó con 10 mL de agua destilada.
- Se agitó por durante 5 minutos.

La presencia de espuma (2 mm) con persistencia indica positivo “+”.

ENSAYO DE NINHIDRINA: indica presencia de aminoácidos libres o aminas.

- A la alícuota correspondiente, se colocó a baño de agua.
- Se mezcló con 2 mL de ninhidrina 2 % v/v.
- Reiteradamente, se colocó a baño de agua por 5 minutos.

La presencia de coloración azul violáceo indica positivo “+”.

ENSAYO DE SHINODA: identifica a flavonoides mediante una reacción de reducción.

- A la alícuota de correspondiente, se diluyó con 1 mL de ácido clorhídrico conc. y un trozo de cinta de magnesio metálico.
- Se dejó actuar por 5 minutos.
- Se añadió 1 mL de alcohol amílico y se agitó.
- Se dejó reposar hasta la separación de fases.

La presencia de coloraciones que van desde amarillo, naranjado, carmelita o rojo intenso en la fase del alcohol amílico, indica positivo “+”.

ENSAYO DE MUCÍLAGOS

- A la alícuota correspondiente, se enfrió hasta conseguir 0 – 5 °C aproximadamente. La presencia de la consistencia viscosa indica positivo “+”.

ENSAYO DE PRINCIPIOS AMARGOS: permite caracterizar a fenoles, lactonas, cromonas u otros compuestos de gusto amargo.

- A la alícuota correspondiente, se procedió a la evaluación sensorial mediante el sabor. La presencia de sabor amargo indica positivo “+”.(Miranda, 2002)

3.7.3. Tratamiento de la droga vegetal

3.7.3.1. Extractos vegetales

Es la práctica de separación de compuestos fitoquímicos de interés, realizada de forma heterogénea; para ello, se emplea disolventes o mensturo acorde a la naturaleza del compuesto bioactivo. El proceso consiste en: *a.* el solvente penetra la matriz sólida; *b.* el soluto se disuelve en el solvente; *c.* el soluto se difunde fuera de la matriz sólida; *d.* recolección de los solutos extraídos (Zhang et al., 2018).

Materiales y equipos:

- Agua destilada
- Etanol 70 % v/v
- Metanol 96 % v/v
- Agua destilada
- Recipientes fotoprotectores
- Papel filtro
- Equipo de filtración a vacío
- Rotavapor
- Balanza analítica
- Baño de agua

Procedimiento:

A. *R. communis* (extracto metanólico)

1. Se realizó limpieza de las hojas con agua destilada.

2. Se desecó el material vegetal en estufa a 40 °C con circulación forzada.
3. Se trituró hasta obtener polvo fino.
4. En un recipiente fotoprotector, se colocó el material vegetal seco y se vertió metanol 96 % v/v en relación 1:10.
5. Se maceró a temperatura ambiente durante 7 días con agitación ocasional.
6. Se filtró a vacío con papel de filtro Whatman n.º 1.
7. Se concentró el filtrado en rotavapor hasta sequedad (40 °C), con la finalidad de extraer el solvente empleado.
8. Recolectar el material vegetal seco en frasco ámbar.
9. Redisolver los mg de extracto seco en 10 mL de DMSO 10 % obteniendo la solución madre.
10. Se almacenó a 4 °C hasta su utilización. (Naz y Bano, 2012; Elkousy et al., 2021)

B. *C. lechleri* (extracto de taninos catéquicos)

1. El material vegetal seco se extrajo con solución de acetato de etilo y agua en relación 90:10.
2. Posterior a la maceración de 24 horas, se filtró conservando el sobrenadante.
3. Se agregó 20 gramos de Na₂SO₄ anhidro como agente deshidratante de la solución orgánica.
4. El filtrado se sometió a evaporación a presión reducida en rotavapor (40 °C) conservando 10 % de su volumen.
5. Se adicionó 200 mL de éter de petróleo como agente de precipitación antidisolvente.
6. Se filtró a vacío conservando la fracción de proantocianidinas precipitadas.
7. Se almacenó en el desecador hasta su utilización. (Pekic et al. 1998)

C. *P. volubilis* (extracto etanólico)

1. Se realizó limpieza de las hojas con agua destilada.
2. Se desecó el material vegetal en estufa a 40 °C circulación forzada.
3. El extracto se preparó en relación 1:15 de muestra seca en etanol al 70 %, contenido en envase ámbar.
4. Se maceró a temperatura ambiente durante 7 días con agitación ocasional y se aseguró cierre hermético.
5. Se filtró a vacío con papel de filtro Whatman n.º 1.
6. Se concentró el filtrado en rotavapor hasta sequedad a 40 °C, con la finalidad de extraer el solvente empleado.
7. Se colocó en un baño de agua a 40 °C para obtener productos semisólidos.
8. Se recolectó el material vegetal seco en frasco ámbar.
9. Redisolver los mg de extracto seco en 10 mL de DMSO 10 % obteniendo la solución madre en mg/mL (ppm).
10. Se almacenó a 4 °C hasta su utilización. (Jang, You y Kim, 2020)

3.7.4. *Preparación de las soluciones del material vegetal*

Materiales y equipos:

- Tubos eppendorf
- Rotulador
- Gradilla
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- DMSO 10 %
- Preparado vegetal
- Cabinas de seguridad biológica

Para investigar la actividad antibacteriana de cada extracto vegetal, se llevaron a cabo diluciones, los cuales fueron designados como soluciones simples. En tubos eppendorf estériles y rotulados previamente, se colocó tres diluciones correspondientes a 10^{-1} ; 10^{-2} , 10^{-3} y la solución madre del preparado vegetal:

- Dilución 10^{-1} : 900 μ L de DMSO + 100 μ L de solución madre.
- Dilución 10^{-2} : 900 μ L de DMSO + 100 μ L de dilución 10^{-1} .
- Dilución 10^{-3} : 900 μ L de DMSO + 100 μ L de dilución 10^{-2} .
- Solución madre: 1000 μ L.

Mientras que, para el estudio del efecto combinado (diluciones del preparado vegetal y antibiótico), se preparó soluciones combinadas:

- Combinación 1: 500 μ L de dilución 10^{-1} + 500 μ L de clorhexidina 0,2 %.
- Combinación 2: 500 μ L de dilución 10^{-2} + 500 μ L de clorhexidina 0,2 %.
- Combinación 3: 500 μ L de dilución 10^{-3} + 500 μ L de clorhexidina 0,2 %.
- Solución madre: 1000 μ L.

3.7.5. *Difusión en disco (método Kirby-Bauer)*

La difusión en disco, conocido también como Kirby-Bauer es un método estandarizado y aprobado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) y la FDA. Permite estudiar el grado de sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas estandarizadas con la aplicación de discos con antibióticos de interés (almacenados previamente a 8 °C o congelados a -14 °C) sobre la superficie del agar Mueller Hinton (MH). El resultado se reporta en base a los puntos de corte (Suplemento CLSI M100) que categorizan a la bacteria en

sensible, intermedio o resistente midiendo los rangos de inhibición durante la incubación. (Tenover, 2015)

Materiales y equipos:

- Extractos vegetales
- Reactivos de medios de cultivo
- Clorhexidina 0,2 % solución acuosa
- DMSO 10 %
- Cepa *S. mutans* ATCC® 25175™
- Hisopos estériles
- Discos en blanco
- Asa de inoculación de 10 µL
- Pinza
- Alcohol desinfectante
- Mechero
- Micropipeta
- Placas Petri de 90 mm
- Agitador Vortex
- Jarra GasPak
- Estufa
- Cabinas de seguridad biológica

Para el procedimiento se consideró la regla “15-15-15 minutos” dispuesta por Eucast (2024), una vez reactivada la bacteria:

1. En los 15 minutos siguientes de la preparación del estándar de turbidez equivalente a 0.5 de la escala McFarland, se sumergió el hisopo estéril y se tomó el inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 sin eliminar el exceso de líquido.
2. Se extendió el inóculo uniformemente en la superficie del medio sólido de MH, mediante la técnica de siembra masiva y contorneada de bordes.
3. Luego de transcurrir un periodo de 15 minutos desde la inoculación, con una pinza estéril se colocó discos secos (acondicionados a temperatura ambiente) respetando separación de 12 – 16 mm de borde a borde al situarlos sobre la superficie del agar.
 - a. Los discos en blanco fueron previamente impregnados y reposados al menos 30 minutos con:
 - i. 15 µL de las soluciones correspondientes descrito en el apartado 3.6.4.
 - ii. 15 µL de clorhexidina 0,2 % solución acuosa, como control positivo.
 - iii. 15 µL de DMSO, como control negativo.
4. Una vez finalizado de aplicar los discos, se colocó las placas de agar en posición invertida.

5. Después de 15 minutos de su aplicación, se incubó en condiciones anaeróbicas: empleando una jarra de GasPak* a temperatura de 35 ± 1 °C y atmósfera de 5 – 10 % CO₂ en aire, durante 24 horas.
6. La lectura de las zonas se realizó a simple vista considerando ángulo de 45° y 30 cm de distancia, por el reverso con luz reflejada sobre un fondo oscuro. Para la medición de los diámetros (incluyendo el diámetro del disco) se empleó regla.
7. Se registró los diámetros de inhibición obtenidos.

El proceso fue ejecutado por triplicado y documentado en valores promedio (Hudzicki 2009; Eucast 2024).

Se consideró documentar la actividad antibacteriana de los preparados vegetales en función a las zonas de inhibición medidos, bajo la siguiente expresión (Naz y Bano, 2012):

$$\frac{\text{Porcentaje relativo de inhibición (PRI)}}{= \frac{100 \times (\text{ATI preparado vegetal} - \text{ATI control negativo})}{\text{ATI control positivo} - \text{ATI control negativo}}$$

Donde,

PRI: Porcentaje relativo de inhibición

ATI: Área total de inhibición

Considerando que el área total fue calculada con su equivalencia πr^2 y r: radio de la zona de inhibición (mm).

3.7.5.1. Evaluación del preparado vegetal y control positivo combinados

Para estudiar el efecto potenciador se realizó la combinación de clorhexidina y la dilución con mayor halo de inhibición resultante. Siguiendo:

1. Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta la colocación de discos sobre la superficie del agar MH, siguiendo:
 - a. Los discos en blanco fueron previamente impregnados y reposados al menos 30 minutos con:
 - i. 15 µL de solución combinada: relación 1:1 de la dilución que presentó mayor halo en el anterior procedimiento y clorhexidina al 0,2 % correspondientemente.
 - ii. 15 µL de clorhexidina 0,2 %, como control positivo (C⁺).
 - iii. 15 µL de DMSO, como control negativo.
2. Una vez finalizado de aplicar los discos, se colocó las placas de agar en posición invertida.
3. Después de 15 minutos de su aplicación, se incubó en condiciones anaeróbicas: empleando una jarra de GasPak* a temperatura de 35 ± 1 °C y atmósfera de 5 – 10 % CO₂ en aire, durante 24 – 48 horas.

4. La lectura de las zonas se realizó a simple vista considerando ángulo de 45° y 30 cm de distancia, por el reverso con luz reflejada sobre un fondo oscuro. Para la medición de los diámetros (incluyendo el diámetro del disco) se empleó regla.
5. Se registró los diámetros de inhibición obtenidos y reportados bajo la misma expresión matemática de la sección 3.6.5. (Barrios et al., 2021).

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Procesamiento, análisis, interpretación de resultados y discusión

4.1.1. Control de calidad de la droga vegetal

4.1.1.1. Evaluación macroscópica

Para el análisis macroscópico foliar de *R. communis* y *P. volubilis*, se recolectaron tres muestras aleatorias y representativas provenientes de distintas ramas de cada planta, mismas que cumplían con los criterios de inclusión mencionados en la sección 3.5.1. Estas muestras vegetales fueron sometidas a un proceso de limpieza empleando agua destilada. Por otro lado, se adquirió envases de látex de *C. lechleri* comercializados por habitantes de la provincia de Francisco de Orellana, Ecuador.

Tabla 4-1: Evaluación macroscópica de *R. communis*, *C. lechleri* y *P. volubilis*

ESPECIE VEGETAL	MUESTRA VEGETAL	PARÁMETROS	CARACTERÍSTICAS
<i>R. communis</i>	Hojas	Forma	Simple, palmipartidas, penninervadas y aserrada
		Tamaño promedio	31,00 x 39,22 cm
		Textura	Membranoso
		Superficie	Glabras
		Color	Verde
		Olor	Acre
		Condición	Fresco
<i>C. lechleri</i>	Látex	Color	Marrón – rojizo oscuro
		Olor	Terroso con matiz salado
		Aspecto	Lechoso
		Sabor	Astringente y amargo
		pH	3,65
<i>P. volubilis</i>	Hojas	Forma	Simple, cordada, acuminado y ondulado
		Tamaño promedio	10,20 x 7,98 cm
		Textura	Membranosa
		Superficie	Pubescente
		Color	Verde
		Olor	Acre
Condición	Fresco		

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Las características foliares de la especie *R. communis* reportadas en la Tabla 4-1 concuerdan con la investigación de Nour et al. (2023) centrada en la caracterización morfológica. Sin embargo, la anchura de las hojas del presente estudio, se encuentran por encima del parámetro (7,89 – 34,39 cm). Esta variación morfométrica podría deberse a las propiedades químicas del suelo característica de la región.

Referente al látex de *C. lechleri*, presentó pH más ácido (Tabla 4-1) en comparación con el estudio Montopoli et al. (2012), quien determinó que la savia recolectada directamente por incisión en la corteza fue de pH de 3,9. Las ligeras variaciones de pH pueden estar sujetas a las condiciones ambientales de recolección de la planta e incluso por mezclas de solventes para estabilizar el látex (Ramírez 2003).

Finalmente, la evaluación macroscópica de las hojas de *P. volubilis* (Tabla 4-1), coinciden con las descripciones proporcionadas por DOSTERT et al, en el proyecto de Datos botánicos de Sacha Inchi publicado en 2009, afirmando la identificación del taxón.

4.1.1.2. Determinación de humedad

En la Tabla 4-2, se detalla los resultados obtenidos de la determinación de humedad en cada especie vegetal.

Tabla 4-2: Resultados de humedad en *R. communis*, *C. lechleri* y *P. volubilis*

ESPECIE VEGETAL	MUESTRA VEGETAL	HUMEDAD (%)	
		RESULTADO	REFERENCIA
<i>R. communis</i>	Hojas	8,19 ± 0,06	8,00 – 14,00
<i>C. lechleri</i>	Látex	9,26 ± 0,12	8,00 – 14,00
<i>P. volubilis</i>	Hojas	8,51 ± 0,14	8,00 – 14,00

Fuente: (USP 42 - NF 37 2019; Who 2011)

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Todos los valores reportados se encuentran dentro de los parámetros indicados por la USP 42 - NF 37 (2019) y por Who (2011) señalando, que la materia prima reúne las condiciones idóneas, lo que significa que se evitará reacciones químicas que deterioren la calidad de vida útil y proliferación de microorganismo, así como también permitirá la retención de la composición de metabolitos secundarios (Park et al., 2021).

En comparación con la investigación de Yerovi realizada en el año 2018, presentó para *R. communis* un 5,7 % de humedad en hojas, porcentaje que se encuentra por debajo de las especificaciones, justificado por la técnica y época de recolección. Para el látex seco de *C. lechleri*, se obtuvo 8,70 % mismo que cumple el límite de referencia (Arellano, 2017).

No obstante, debido a la escasez de investigaciones previas de control de calidad en muestras foliares de *P. volubilis*, se ha limitado la disponibilidad de datos para la recopilación y comparación. Esta restricción implicó generalización de resultados obtenidos.

4.1.1.3. Determinación de cenizas

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, se determinó el porcentaje de cenizas detallado en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Cenizas totales, insolubles en ácido y solubles en agua de *R. communis*, *C. lechleri* y *P. volubilis*

PARÁMETROS	ESPECIE VEGETAL			REFERENCIA
	<i>R. communis</i> (hojas)	<i>C. lechleri</i> (látex)	<i>P. volubilis</i> (hojas)	
C _T (%)	7,93 ± 0,04	0,45 ± 0,04	7,20 ± 0,17	8,00 ^a 0,325 – 0,682 ^b
C _{ac} (%)	1,46 ± 0,15	0,20 ± 0,01	1,86 ± 0,18	2,00
C _{ag} (%)	0,55 ± 0,12	0,22 ± 0,12	0,34 ± 0,05	1,00

C_T: Cenizas totales; C_{ac}: cenizas solubles en agua; C_{ag}: Cenizas insolubles en ácido; ^a: referencia para *R. communis* y *P. volubilis*; ^b: referencia para *C. lechleri*.

Fuente: Cabello et al. 1998; Real Farmacopea Española 2005

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Los datos obtenidos se compararon con los criterios de control de calidad establecidos por la Real Farmacopea Española (2005) para las muestras foliares de *R. communis* y *P. volubilis* y Cabello et al. (1998) para el látex. Los valores porcentuales de la Tabla 4-3, se encuentran en los límites de referencia de los residuos derivados de tejidos vegetales, residuos que provienen del medio ambiente, tierra silíceo, óxidos, carbonatos, oxalatos, fosfatos y metales pesados.

Los resultados de la determinación de cenizas en *R. communis* obtenidos por (Yerovi, 2018) y la muestra seca del látex de sangre de drago en el estudio de Cabello et al. (1998), concuerdan con las especificaciones y el presente trabajo investigativo. Referente a las hojas de *P. volubilis*, la bibliografía científica se encuentra limitada.

4.1.2. Marcha fitoquímica

El cribado fitoquímico de las tres especies vegetales se resumió en la Tabla 4-4, empleándose tres solventes de distinta polaridad: éter, etanol y agua. Se comparó los resultados de las hojas de *R. communis* en los distintos solventes, y se evidenció que existe mayor variedad de compuestos extraídos en el solvente etanólico, indicando la presencia de triterpenos y/o esteroides, flavonoides, coumarinas, alcaloides, y aminoácidos libres y aminoras en general.

En el caso de los metabolitos del látex *C. lechleri*, presentaron mayor afinidad en la fracción acuosa, destacando principalmente alcaloides, seguido de los compuestos fenólicos, flavonoides,

saponinas y otros compuestos de diversa naturaleza química (principios amargos). No obstante, la fracción etérea también demuestra la presencia significativa de alcaloides y compuestos grasos.

Y en la detección de metabolitos en *P. volubilis*, se observó mayor riqueza de compuestos en el extracto etanólico. A diferencia de *R. communis* (extracto etanólico), se presenciaron, además, fenoles, resinas y saponinas, pero no coumarinas y flavonoides de tipo C₆-C₃-C₆. En el solvente apolar, se extrajeron menos compuestos alcaloides. Y en el extracto acuoso, aparecen carbohidratos reductores y otros compuestos de naturaleza identificada (principios amargos).

Tabla 4-4: Caracterización de metabolitos secundarios en extracto etéreo, etanólico y acuoso.

ENSAYO	TIPO DE EXTRACTO	RESULTADOS		
		<i>R. communis</i> (hojas)	<i>C. lechleri</i> (látex)	<i>P. volubilis</i> (hojas)
Sudán	Etéreo	-	+	-
Dragendorff		+	+++	+
Mayer		+	+	+
Wagner		+	++	++
Baljet		+	-	-
Lieberman-Burchard		+	-	+
Fehling	Etanólico	-	+	-
Lieberman-Burchard		+	+	+
Cloruro férrico		-	-	+
Resinas		-	+	+
Shinoda		+	+	+
Börntrager		-	++	-
Baljet		+	+	-
Dragendorff		+++	++	++
Mayer		++	+	++
Wagner		++	+	++
Ninhidrina		+	-	+
Espuma		-	+	+
Antocianinas		+	+	-
Dragendorff		+	+++	++
Mayer	+	+++	++	
Wagner	+	+++	++	
Cloruro férrico	+	+	+	
Shinoda	+	+	+	
Fehling	+	-	+	
Espuma	+	+	+	
Mucílagos	-	-	-	
Principios amargos	+	+	+	

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Al contrastar con el análisis preliminar de los compuestos fitoquímicos presentes en *R. communis*, realizado por Suubaar et al. (2017), se determinó que los resultados coinciden. El mejor solvente extractante resultó ser la solución alcohólica, solubilizando a los terpenos, flavonoides, alcaloides y otros. Sin embargo, mencionan que el rendimiento de extractabilidad aumentó empleando

metanol, obteniendo mayor compuestos terpenoides, a los cuales se les atribuye efecto antioxidante y antibacteriano (disuelven la pared bacteriana).

Por otra parte, el lático de *C. lechleri* presenta dos fracciones importantes, una de ellas, es alcoholoidal (9 %) que corresponde a la taspina y es soluble en solventes apolares, confirmando su presencia en la extracción etérea. Sin embargo, esta molécula ejerce actividad cicatrizante y antiulcerosa. La fracción restante, es significativamente permeable con la presencia de agua destacando la extracción de compuestos fenólicos (90 %) y estos responden a la acción antimicrobiana y antioxidante (Diedrich et al. 2021).

Finalmente, en la investigación de MHD y LEE (2022) realizaron el perfil fitoquímico de las hojas de *P. volubilis* y evaluaron que el solvente etanólico presentó mayor contenido de metabolitos, en lugar de solventes como metanol, hexano y agua. La extracción etanólica presentó alcaloides, esteroides, taninos, saponinas y flavonoides, mismos que coinciden con el presente trabajo investigativo.

4.1.3. Difusión en disco (método Kirby-Bauer)

La presente investigación analizó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión discal y se comparó con el porcentaje relativo de inhibición (PRI) de la solución acuosa de CHX 0,2 % (control positivo - 100 %) y el DMSO 10 % como control sin solución inhibidora (control negativo - 0 %). Después de la incubación de *S. mutans*, se obtuvo que, dos de las tres especies evaluadas exhibieron actividad en la solución madre.

El extracto metanólico de las hojas de *Ricinus communis* no mostró actividad antibacteriana. Esto se evidenció al obtener un diámetro de 6 mm en las pruebas, correspondiente únicamente al tamaño del disco de ensayo, sin presencia de halo de inhibición alrededor. Este resultado implica un porcentaje relativo de inhibición (PRI) del 0 % para las concentraciones evaluadas de 768000 mg/L, 76800 mg/L, 7680 mg/L y 768 mg/L, como se detalla en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5: Halos y porcentajes relativos de inhibición de *R. communis* y controles

INHIBICIÓN DE LOS PREPARADOS VEGETALES						
	Diámetro (mm)				Área	PRI (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Media		
<i>Ricinus communis</i>						
SM 768000 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10⁻¹ 76800 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10⁻² 7680 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10⁻³ 768 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Control positivo 0,2 %	18	19	20	19,00	283,53	100,00
Control negativo 10 %	6	6	6	6,00	28,27	0,00

Rep.: Repetición; PRI: Porcentaje relativo de inhibición; SM: solución madre.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Estos datos fueron procesados mediante un diagrama de barras para mejorar su interpretación, en él se muestra el diámetro promedio de inhibición (eje de las ordenadas) frente a diferentes concentraciones del extracto metanólico de las hojas de *Ricinus communis* y los controles positivos y negativos (eje de las abscisas).

La Ilustración 4-1, indica que todas las concentraciones evaluadas (desde 768000 mg/L hasta 768 mg/L), no presenta actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, ya que no se observó halo de inhibición alrededor del disco de ensayo. En contraste, el control positivo (clorhexidina 0,2 %) mostró un halo de inhibición significativo, con un diámetro promedio de 19 mm, confirmando su efectividad antibacteriana.

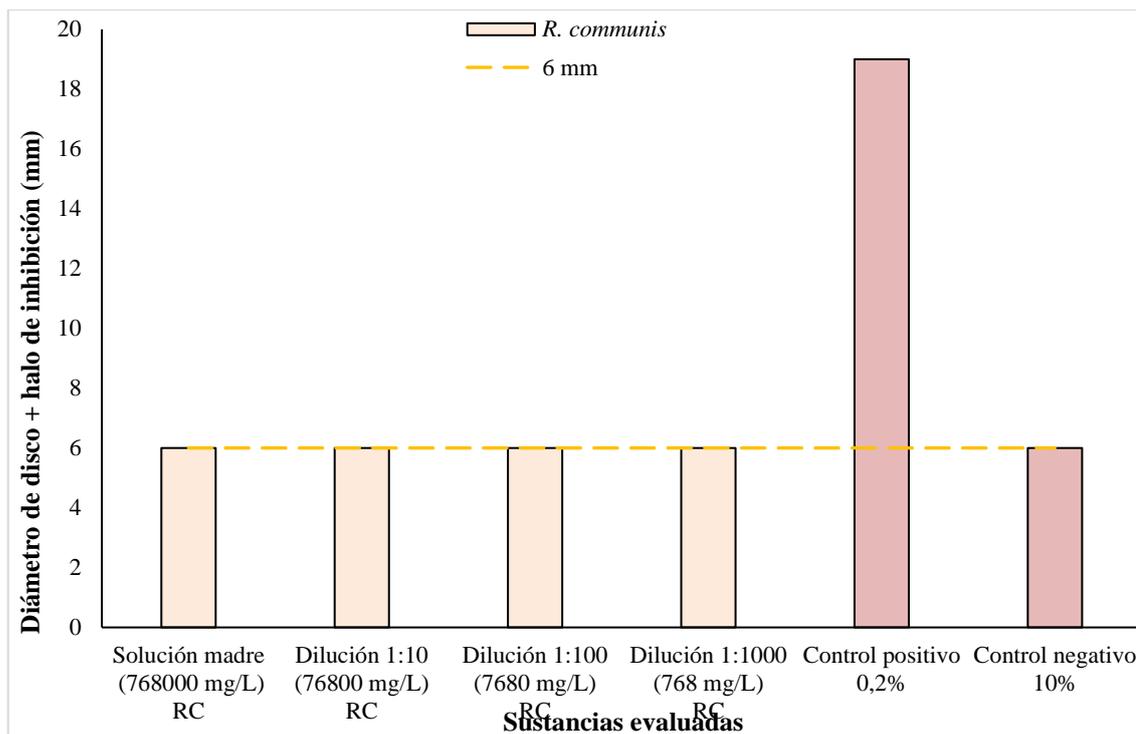


Ilustración 4-1: Diagrama de barras del diámetro de disco + halo de inhibición VS las sustancias evaluadas en *R. communis*, control positivo y control negativo.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Sin embargo, comparando con un estudio realizado por Naz y Bano en el año 2012, determinó actividad antibacteriana a una concentración de 12000 mg/L frente a cepas gram positivas como *B. subtilis* y *S. aureus*, así como a cepas gram negativas como *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

En otra investigación titulada “Actividades antibacterianas y antifúngicas y perfil fitoquímico del extracto foliar de diferentes extractantes de *Ricinus communis* frente a patógenos seleccionados” realizada en 2017 por Suubaar et al., estudiaron el mismo extracto foliar, pero a concentraciones entre 3130 mg/L hasta 200000 mg/L, los cuales se probaron en *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *C. albicans* y exhibieron una potencial inhibición de crecimiento en los patógenos estudiados.

Esta ausencia de actividad antibacteriana en el extracto de *R. communis* podría deberse a diferentes razones, por ejemplo, que las especies vegetales están sujetas a la variación natural intraespecífica, es decir, la expresión de polimorfismos genéticos causados por la distribución geográfica y/o condiciones ambientales (luz, presión atmosférica, temperatura, latitudes, nutrientes, entre otros) en los sitios de recolección (Pais, LI, Xiang 2018).

En consecuencia, se podrían generar cambios en las sustituciones de aminoácidos y el perfil metabolómico presentaría grandes diferencias. Este fenómeno alteraría la cuantificación de alcaloides, terpenoides, flavonoides, saponinas, etc. (Pais, Li, Xiang 2018). Otro factor posible, es el proceso de defensa del *S. mutans* que implica activación de genes *rgp* en la pared celular y confiere efecto nulo del antibiótico (Tsuda et al. 2002).

Por otra parte, se menciona incluso una falta de unión de las moléculas bioactivas del extracto en la superficie del *S. mutans*. Esto conlleva a una limitación de los compuestos heterogéneos bioactivos en penetrar la pared y/o membrana de la cepa bacteriana, como se evidencia en la investigación de GHRAMH et al. en el año 2019.

Los autores compararon la actividad antimicrobiana del extracto crudo frente a nanopartículas de oro (AuNPs) elaboradas a partir del mismo extracto de *R. communis*. Los resultados de los diámetros de las zonas de inhibición fueron significativamente mayores en las AuNPs, puesto que, por su tamaño mejoró la distribución y penetración del fitol, α -amirina, lupeol y otros compuestos en la membrana celular (Ghranh et al. 2019).

En el caso del extracto del látex de *C. lechleri*, presentó un PRI equivalente a 115,14 % a la concentración de 12516 mg/L en la solución madre, superando la efectividad del control positivo. Sin embargo, a concentraciones inferiores de este extracto (1251,6 mg/L, 125,16 mg/L y 12,52 mg/L) no se evidenció actividad, como se detalla en la Tabla 4-6 e Ilustración 4-2.

Tabla 4-6: Halos y porcentajes relativos de inhibición de *C. lechleri* y controles.

INHIBICIÓN DE LOS PREPARADOS VEGETALES						
	Diámetro (mm)				Área	PRI (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Media		
<i>Croton lechleri</i>						
SM 12516 mg/L	22	21	21	21,33	357,44	115,14
Dilución 10 ⁻¹ 1251,6 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10 ⁻² 125,16 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10 ⁻³ 12,52 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Control positivo 0,2 %	19	20	20	19,67	303,77	100,00
Control negativo 10 %	6	6	6	6,00	28,27	0,00

Rep.: Repetición; PRI: Porcentaje relativo de inhibición; SM: solución madre.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Esto se representa en la Ilustración 4-2 que indica que el extracto de *C. lechleri* presenta una notable actividad antibacteriana en la solución madre (12516 mg/L), evidenciada por un halo de

inhibición de 21,33 mm. Sin embargo, sus diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) no muestran actividad frente a la bacteria evaluada con un diámetro de disco de 6 mm.

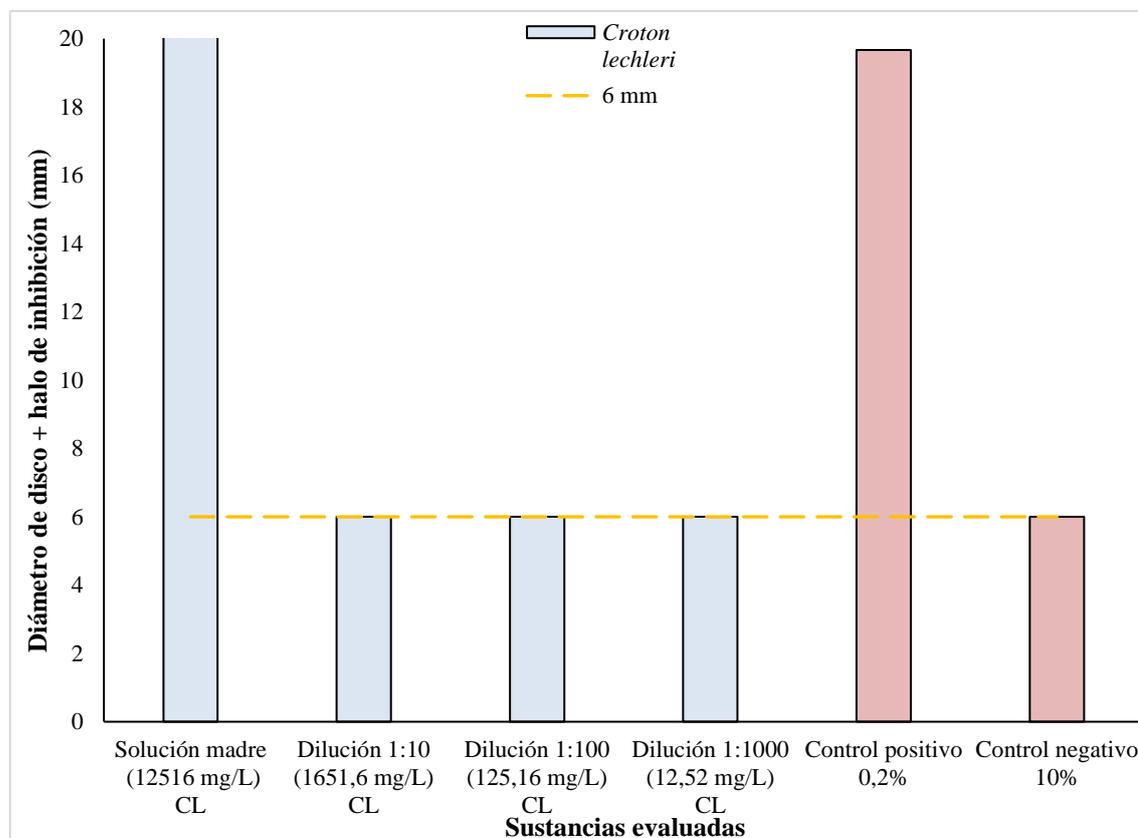


Ilustración 4-2: Diagrama de barras del diámetro de disco + halo de inhibición VS las sustancias evaluadas en *C. lechleri*, control positivo y control negativo.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

En contraste con otros estudios enfocados en la determinación de la actividad antibacteriana en *S. mutans*, llevados a cabo por Avilés et al. en 2018, Cayo y Barrera en 2014 y Guevara en el año 2020, se ha evaluado al látex en su estado puro y a sus respectivas diluciones en agua destilada, los cuales mostraron halos de inhibición que oscilaron entre los 8 y 17 mm a concentraciones de 50 %, 75 % y 100 %.

En la presente investigación, el extracto de taninos catéquicos demostró efecto inhibitorio posiblemente por la presencia de catequinas, epicatequinas, galocatequinas y epigalocatequinas según Risco et al. (2005). Se conoce que las catequinas y sus análogos, evitan la formación de aglomerados de *S. mutans* al reducir expresiones génicas que codifican la enzima glicosiltransferasa, interfiriendo en la conversión a glucano y con esto, la formación de matrices de exopolisacáridos (Zayed et al. 2021).

Estas moléculas bioactivas continúan con la destrucción del *S. mutans*, induciendo a la disminución de la D-alanilación y liberación de ácidos teicoicos maduros, que resultan en el debilitamiento de la capa de peptidoglicano (Zayed et al. 2021). Además, poseen un mecanismo de defensa que evita la salida del extracto vegetal y es mediante la inhibición de la funcionalidad de las bombas de eflujo de la bacteria (Wu, Brown 2021).

En lo que respecta al extracto foliar de *P. volubilis* con solvente etanólico, los resultados (Tabla 4-7) demostraron actividad inhibitoria en *S. mutans* a concentración de solución madre de 168300 mg/L (equivalente al 4,16 % con respecto al control positivo). Mientras que, en las diluciones 16830 mg/L, 1683 mg/L y 168,3 mg/L no se observó efecto.

Tabla 4-7: Halos y porcentajes relativos de inhibición de *P. volubilis* y controles

INHIBICIÓN DE LOS PREPARADOS VEGETALES						
	Diámetro (mm)				Área	PRI (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Media		
<i>Plukenetia volubilis</i>						
SM 168300 mg/L	7	7	7	7,00	38,48	4,16
Dilución 10⁻¹ 16830 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10⁻² 1683 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10⁻³ 168,3 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Control positivo 0,2 %	18	19	19	18,67	273,67	100,00
Control negativo 10 %	6	6	6	6,00	28,27	0,00

Rep.: Repetición; PRI: Porcentaje relativo de inhibición; SM: solución madre.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Estos resultados se reflejan en la Ilustración 4-3, que muestra cómo el diámetro del halo de inhibición de la solución madre (7 mm) es ligeramente notable en comparación con las concentraciones diluidas del mismo extracto, que no presentan actividad anti estreptocócica. A pesar de que el halo de inhibición es pequeño, se puede asumir la presencia del efecto anti estreptocócica.

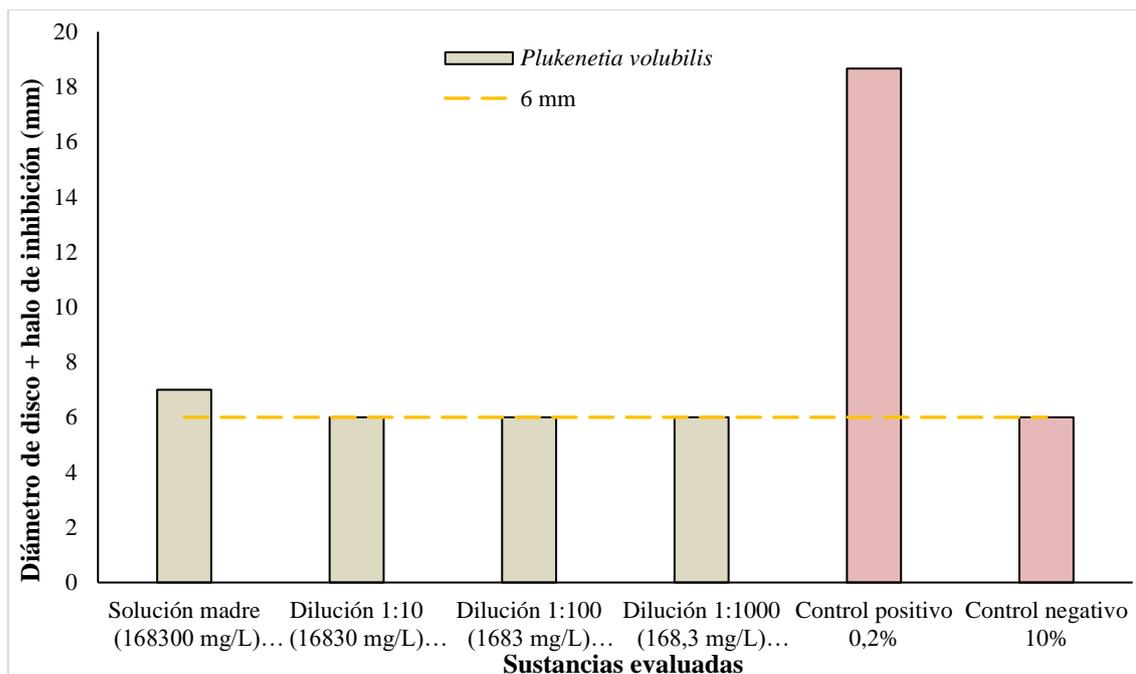


Ilustración 4-3: Diagrama de barras del diámetro de disco + halo de inhibición VS las sustancias evaluadas en *P. volubilis* control positivo y control negativo.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Según una investigación realizada por Jang, You y Kim (2020), compararon la actividad antibacteriana de *P. volubilis* procedentes de dos sitios de recolección en Corea, con condiciones climáticas distintas. Los resultados son significativamente superiores en la especie recolectada de la región con mayor precipitación anual, mostrando inhibición moderada (7 - 10 mm) desde los 125 mg/L hasta los 2000000 mg/L ensayadas en *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleaeusis*, *S. marcescens*, *S. sonnei*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Tabla 4-8: Halos y porcentajes relativos de inhibición de *P. volubilis* y controles

INHIBICIÓN DE LOS PREPARADOS VEGETALES						
	Diámetro (mm)				Área	PRI (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Media		
<i>Plukenetia volubilis</i>						
SM 168300 mg/L	7	7	7	7,00	38,48	4,16
Dilución 10 ⁻¹ 16830 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10 ⁻² 1683 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Dilución 10 ⁻³ 168,3 mg/L	6	6	6	6,00	28,27	0,00
Control positivo 0,2 %	18	19	19	18,67	273,67	100,00
Control negativo 10 %	6	6	6	6,00	28,27	0,00

Rep.: Repetición; PRI: Porcentaje relativo de inhibición; SM: solución madre.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

Los resultados de la Tabla 4-7, posiblemente se debe a la variación natural intraespecífica, como se detalló anteriormente. La zona de recolección de *P. volubilis*, en el presente estudio, se ejecutó en Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador, con un promedio de precipitación anual de 3000 - 4000 mm en comparación con el estudio de Jang, You, Kim (2020), recolectada en la zona de Yangon, Corea, que presenta siete veces más suelos aluviales con mayor contenido de nutrientes, y con ello, el contenido cuantitativo de compuestos fenólicos y flavonoides varía.

Sin embargo, la fracción disponible que responde a la inhibición se puede deber a la mezcla heterogénea de compuestos solubles en etanol, efectuando posiblemente la actividad los oligómeros de quercetina, catequinas, kaemferol, triterpenoides y saponinas (Mhd, Lee 2022). Numerosas investigaciones demuestran que estos compuestos son responsables de la actividad antibiofílmicas y antibacterianas (Mhd, Lee 2022).

De manera que, primero actúan las catequinas inhibiendo la formación de biofilms, como se mencionó previamente en *C. lechleri*. Posterior, se producen alteraciones en la permeabilidad de la pared y membrana celular, a causa de las hidroxilaciones de la estructura química de la quercetina y kaemferol. Esto desencadena procesos de adelgazamiento, desvanecimiento del peptidoglucano y separación de las dos estructuras (Zeng et al. 2019).

Este efecto de alteración estructural de la pared es potenciado por los triterpenoides, que actúan como sinergistas a los flavonoides (Wronska et al. 2022), y favorece que las saponinas ingresen, se unan y desestabilicen más la membrana citoplasmática provocando citólisis, fuga de proteínas y enzimas, cambios en el metabolismo y finaliza en muerte celular (L et al. 2023).

4.1.3.1. Evaluación del preparado vegetal y control positivo combinados

Se evaluaron tres combinaciones considerando que las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} no presentaron inhibición (véase la sección 4.1.3.). El efecto nulo de los metabolitos secundarios de *R. communis*, *C. lechleri* y *P. volubilis* a concentraciones inferiores de la solución madre podría atribuirse a una falta de unión de las moléculas del extracto a las estructuras biológicas de la bacteria y/o por mecanismo de defensa del *S. mutans*.

Sin embargo, los halos de las combinaciones presentaron reducción del efecto de CHX. Se podría inferir que la combinación con CHX habría mejorado la fluidez de los metabolitos secundarios y el paso por la pared celular, evitando así la respuesta de defensa de la bacteria (Mohammadi 2008).

Los resultados de las combinaciones de las tres especies vegetales se detallan en la Tabla 4-8. En *R. communis* se registró 56,76 % (15,33 mm) en la primera combinación, 82,10 % (18 mm) en la segunda y 92,65 % (19 mm) en la tercera. Referente a *C. lechleri* se obtuvo 72,13 %, 82,10 % y 92,65 %, respectivamente. Y para *P. volubilis*, 34,38 % (12,33 mm) en la primera combinación, y 85,26 % (18 mm) y 96,22 % (19 mm) en las combinaciones subsiguientes.

Tabla 4-9: Resultado del efecto de combinación entre clorhexidina 0,2 % y los extractos vegetales

COMBINACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y CONTROL POSITIVO						
	Diámetro (mm)				Área	PRI (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Media		
<i>Ricinus communis</i>						
Combinación 1	16	15	15	15,33	184,66	56,76
Combinación 2	18	18	18	18,00	254,47	82,10
Combinación 3	19	19	19	19,00	283,53	92,65
Control positivo	19	20	20	19,67	303,77	100,00
Control negativo	6	6	6	6,00	28,27	0,00
<i>Croton lechleri</i>						
Combinación 1	17	17	17	17,00	226,98	72,13
Combinación 2	18	18	18	18,00	254,47	82,10
Combinación 3	19	19	19	19,00	283,53	92,65
Control positivo	20	20	19	19,67	303,77	100,00
Control negativo	6	6	6	6,00	28,27	0,00
<i>Plukenetia volubilis</i>						
Combinación 1	13	12	12	12,33	119,47	34,38
Combinación 2	18	18	18	18,00	254,47	85,26
Combinación 3	19	19	19	19,00	283,53	96,22
Control positivo	20	19	19	19,33	293,56	100,00
Control negativo	6	6	6	6,00	28,27	0,00

Rep.: Repetición; PRI: Porcentaje relativo de inhibición; Combinación 1: Dilución 10^{-1} + clorhexidina 0,2%; Combinación 2: Dilución 10^{-2} + clorhexidina 0,2%; Combinación 3: Dilución 10^{-3} + clorhexidina 0,2%.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

En conjunto, estos resultados se plasman en la Ilustración 4-4 mostrando que todas las combinaciones de los diferentes extractos vegetales se encuentran por debajo de la línea de tendencia (clorhexidina 0,2 %, equivalente a un halo de inhibición de aproximadamente 19 mm), indicando que la combinación desfavorece la efectividad del antibiótico atribuyendo a una interacción de tipo antagónica.

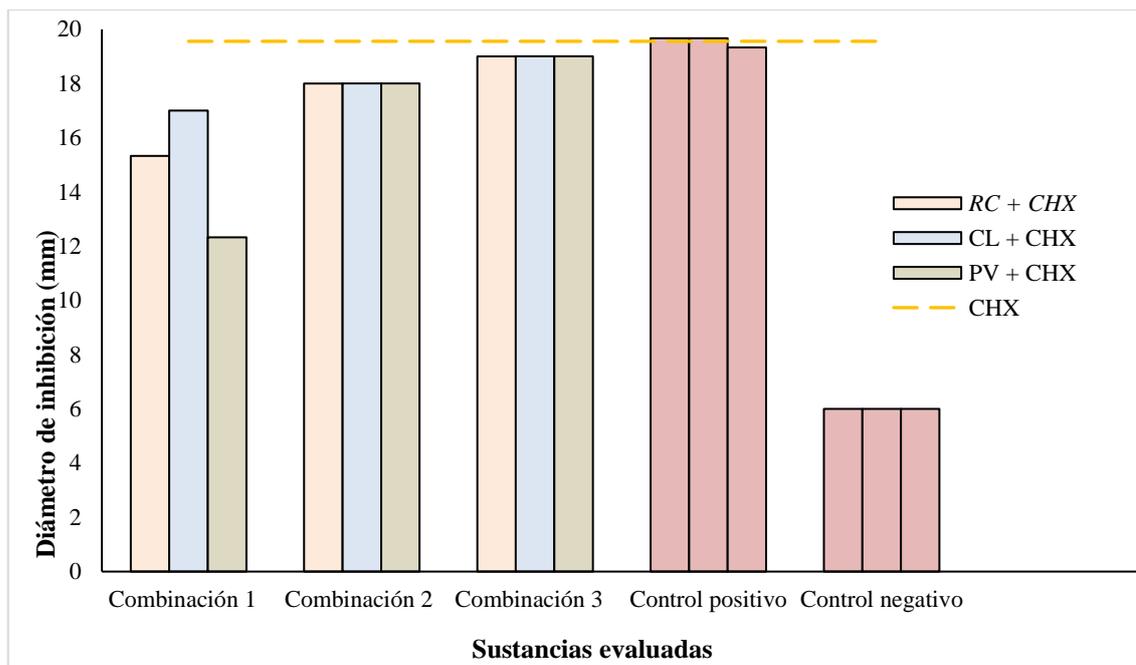


Ilustración 4-4: Diagrama de barras de los diámetros de inhibición de las soluciones combinadas, control positivo y negativo.

Realizado por: León, Mayerli. 2024.

A continuación, se presenta una posible hipótesis del efecto que tendría la combinación de CHX y los extractos vegetales, atribuyendo a moléculas bioactivas probablemente presentes como el fitol, lupeol y α -amirina en las hojas de *R. communis* según Ghramh et al. (2019); catequinas y derivados en el caso del látex de *C. lechleri* (Risco et al. 2005), y quercetinas, catequinas y kaemferol en las hojas de *P. volubilis* (Mhd, Lee 2022).

Siendo así que, las moléculas catiónicas de CHX se unen a los grupos fosfatos de los ácidos teicoicos en la pared celular y penetra por difusión pasiva (Rauch, Leigh 2015). Posterior, el DMSO penetra las cabezas polares y expande la bicapa fosfolipídica favoreciendo la apertura de poros en la membrana celular, esto permite la permeación de los solutos al interior de la célula. (Gurtovenko, Anwar 2007).

Cuando las moléculas bioactivas de los extractos llegan a la membrana celular actúan como antioxidantes, contrarrestando el efecto pro-oxidativo de la CHX, mediante la eliminación de radicales reactivos (OH y NOS) intracelulares. Adicional, los metabolitos de *P. volubilis*, disminuyen el potencial redox al estabilizar iones metálicos de transición (Fe, Cu y Zn) (Sotler 2019). En conjunto, previenen la acumulación de estrés oxidativo y daños en el material genético (Lee et al. 2016).

Sin embargo, la CHX presenta como mecanismo antibacteriano principal, la destrucción de la estructura de la membrana celular, hasta precipitar los componentes citoplasmáticos de bajo peso molecular, formando complejos con grupos fosfatos residuales y finaliza con la muerte de *S. mutans* (Łukomska et al. 2017; Cheung et al. 2012).

Como resultado, la investigación muestra que la combinación de CHX junto al fitol, lupeol, α -amirina, catequinas, quercetinas y kaemferol es poco efectiva, debido a que presentan antagonismo farmacodinámico. Este efecto antioxidante de los metabolitos exhibe una relación directamente proporcional a la concentración de los extractos vegetales. Esto justifica que, en las últimas combinaciones presenta mayor área de inhibición, ya que interactúan más moléculas de CHX y menos moléculas de metabolitos secundarios con *S. mutans*.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se identificaron los metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico, revelando que el solvente alcohólico proporcionó mejor caracterización en las muestras foliares. En las hojas de *R. communis*, se identificó la presencia de triterpenos y/o esteroides, flavonoides, coumarinas, alcaloides y grupos aminos. En *P. volubilis*, presenta los mismos grupos de metabolitos, sumado a estos están compuestos fenólicos, resinas y saponinas. Por otro lado, el extracto acuoso del látex desecado de *C. lechleri* mostró presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, saponinas y principios amargos.

- Se determinó el halo de inhibición a través del método de difusión discal en cada una de las especies vegetales frente a *S. mutans*, para el extracto de taninos catéquicos procedente del látex de *C. lechleri*, se obtuvo 21,33 mm de diámetro de inhibición a 12516 mg/L, siendo un valor superior al halo del control positivo (CHX), mientras que el extracto etanólico – foliar de *P. volubilis* presentó un halo de 7 mm a concentración de 168300 mg/L.

- Se evaluó la actividad antibacteriana producto de la combinación del preparado vegetal y clorhexidina, determinándose interacción antagónica, como consecuencia de las actividades antioxidantes y pro-oxidativas de las sustancias evaluadas.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar un estudio de concentración mínima inhibitoria con el fin de conocer la susceptibilidad de *Streptococcus mutans* a bajas concentraciones.
- Se sugiere realizar un estudio de cuantificación y aislamiento de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana, mediante técnicas cromatográficas y/o espectroscopía.
- Se sugiere continuar con la investigación sobre la combinación de los extractos vegetales y el antibiótico, empleando la técnica del “tablero (*Checkerboard test*) mediante microdilución”, con el propósito de conocer el tipo de interacción a distintas concentraciones experimentales.

GLOSARIO

Concentración mínima inhibitoria: es método cuantitativo que determina la susceptibilidad del microorganismo al inhibir a la concentración más baja (Andrews, 2001).

DMSO: es un compuesto líquido obtenido como subproducto en la producción de papel. En la industria de medicamentos es usado como solvente aprótico polar y apolar (Capriotti y Capriotti, 2012).

Glosedinia: síntoma caracterizado por quemazón, dolor o enrojecimiento en lengua, labios y paladar (Carvajal y Romero, 2023).

Hipogeusia: es un trastorno sensorial caracterizado por la percepción en disminución de la detección de sabores (Henkin, Larson y Powell, 1975).

Índice de la concentración inhibitoria fraccional: es un parámetro que cuantifica el efecto fenotípico (sinérgico, indiferente o antagónico) al combinar antibióticos categorizando según rangos establecidos (Meletiadis et al., 2010).

Interacción antagónica: o subaditividad indica que la concentración más baja de la combinación de los antibióticos es inferior a la potencia y eficacia individual, actuando como antagonistas (Tallarida, 2011).

Interacción indiferente: indica que la combinación de los antibióticos muestra misma actividad tanto en combinación como del compuesto individual más eficaz (Noel, Keevil y Wilks, 2021).

Interacción sinérgica: o subaditividad indica que la concentración más baja de la combinación de los antibióticos es superior a la potencia y eficacia individual, actuando como agonistas (Tallarida, 2011).

Lático: savia producida por células lactíferas en presencia de lesión mecánica. Su contenido biológicamente activo es rico en alcaloides, terpenoides, lignanos, saponinas, etc. (Mazu et al. 2022).

Periodontopatogénos: comprende las diferentes especies microbianas que colonizan la cavidad oral y por proliferación invaden el tejido periodontal (Pihlstrom et al., 2005).

BIBLIOGRAFÍA

1. **ANDREWS, Jennifer**, Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 48, núm. suppl_1, pp. 5–16. DOI 10.1093/jac/48.suppl_1.5.
2. **ARELLANO, Hugo**. Evaluación de la actividad cicatrizante de la crema elaborada a base del extracto atomizado del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado” Ayacucho, 2016 (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ciencias de la salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-Perú. 2017. pp. 1-86.
3. **ARIGBEDE, AbiodunO, BABATOPE, BOsagbemiro & BAMIDELE, MKolude**, Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *Journal of Indian Society of Periodontology*. Vol. 16, núm. 4, p. 487. DOI 10.4103/0972-124X.106878.
4. **AVILÉS, Iván André et al.**, Actividad antibacteriana in vitro de *Croton lechleri* sobre *Streptococcus mutans*. *Odontología Sanmarquina*. Vol. 21, núm. 3, p. 189. DOI 10.15381/os.v21i3.15128.
5. **BARRIOS, Silvia et al.**, Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas que crecen en Colombia y su efecto sobre la actividad de antibióticos β -lactámicos. *Revista Cubana de Farmacia*. Vol. 54, núm. 4, p. e627.
6. **BASCONES, A & FIGUERO, E**, Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en Periodoncia* [en línea]. Vol. 17, núm. 3, pp. 11–12. Recuperado a partir de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852005000300004&lng=es&nrm=iso [consultado 11 noviembre 2023].
7. **BESSA, Lucinda J. et al.**, Managing Oral Health in the Context of Antimicrobial Resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, Vol. 19, Page 16448. Vol. 19, núm. 24, p. 16448. DOI 10.3390/IJERPH192416448.
8. **BUONAVOGLIA, Alessio et al.**, *Streptococcus mutans* Associated with Endo-Periodontal Lesions in Intact Teeth. *Applied Sciences*. Vol. 12, núm. 22, p. 11837. DOI 10.3390/app122211837.

9. **CABELLO, I, SHIRONOSHITA, M & LOCK, O**, Protocolo para el Control de Calidad de la Sangre de Grado. *Revista de Química* [en línea]. Vol. XII, núm. 2, pp. 21–30. Recuperado a partir de: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/5305> [consultado 10 enero 2024].
10. **CAPRIOTTI, Kara y CAPRIOTTI, Joseph A**, Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. Vol. 5, núm. 9, pp. 24–6.
11. **CARVAJAL, Nadia & ROMERO, Guillermo**, Prevalencia de Glosodinia - Síndrome de Boca Ardiente (SBA) y factores de riesgo asociados en la población de Ciudad Real. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. Vol. 30, pp. 15–29. DOI 10.20986/resed.2023.4045/2022.
12. **CASTILLO, Ericson, CASTILLO, Segundo & REYES, Cecilia**, Estudio fitoquímico de *Plukenetia volubilis* L. y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por 3+Fe/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. *albinus*. *UCV - Scientia* [en línea]. Vol. 2, núm. 1, pp. 11–21. Recuperado a partir de : <https://revistas.ucv.edu.pe/index.php/ucv-scientia/article/view/808/798> [consultado 11 noviembre 2023].
13. **CAYO, César & BARRERA, Rodolfo**, Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del *Croton lechleri* sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). *Ciencia y Desarrollo*. Vol. 7, núm. 1, pp. 5–10.
14. **CHEUNG, Hon-Yeung et al.**, Differential Actions of Chlorhexidine on the Cell Wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. Vol. 7, núm. 5, p. e36659. DOI 10.1371/journal.pone.0036659.
15. **CHIRINOS, Rosana et al.**, Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: An alternative source of phenolic compounds and antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 51, núm. 4, pp. 986–993. DOI 10.1111/ijfs.13049.
16. **CIEPLIK, Fabian et al.**, Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria-is there cause for concern? *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10, núm. MAR, p. 587. DOI 10.3389/FMICB.2019.00587/BIBTEX.

17. **CONTARDO, MS et al.**, Oral colonization by *Streptococcus mutans* and its association with the severity of periodontal disease in adults. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. Vol. 4, núm. 1, pp. 9–12. DOI 10.4067/S0719-01072011000100002.
18. **CONVENCIÓN DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**, *Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP 42 NF 37*. Rockville, MD 20852. ISBN 978-1-936424-88-7.
19. **DIEDRICH, Camila et al.**, Bioactive compounds extraction of *Croton lechleri* barks from Amazon forest using chemometrics tools. *Journal of King Saud University - Science*. Vol. 33, núm. 4, p. 101416. DOI 10.1016/j.jksus.2021.101416.
20. **DOSTERT, Nicolas et al.**, Factsheet: Datos botánicos de Sacha Inchi. En: *Desarrollo de monografías botánicas (factsheets) para cinco cultivos peruanos*, pp. 111–111xx. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH: Programa Desarrollo Rural Sostenible – PDRS.
21. **EDEN, Becky**, Prevention Strategies for Periodontal Diseases. En: *Prevention in Clinical Oral Health Care*, pp. 213–229. Elsevier. DOI 10.1016/B978-0-323-03695-5.50020-3.
22. **ELKOUSY, Rawah H. et al.**, Antiviral activity of castor oil plant (*Ricinus communis*) leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 271, p. 113878. DOI 10.1016/j.jep.2021.113878.
23. **EUCAST**, *Antimicrobial susceptibility testing* [en línea]. European Committee On Antimicrobial Susceptibility testing [EUCAST]. EUCAST disk diffusion method 12.0. Recuperado a partir de: <http://www.eucast.org/> [consultado 13 enero 2024].
24. **GASNER, Noah & SCHURE, Ryan**, Enfermedad periodontal - StatPearls - NCBI Bookshelf. *Enfermedad periodontal* [en línea]. 16 agosto 2022. Recuperado a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/?report=classic> [consultado 18 mayo 2023].
25. **GHRAMH, Hamed A. et al.**, Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs) Using *Ricinus communis* Leaf Ethanol Extract, Their Characterization, and Biological Applications. *Nanomaterials*. Vol. 9, núm. 5, p. 765. DOI 10.3390/nano9050765.

26. **GOUDOURI, Ourania-Menti, KONTONASAKI, Eleana & BOCCACCINI, Aldo R.**, Layered scaffolds for periodontal regeneration. En : *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, pp. 279–295. Elsevier. DOI 10.1016/B978-0-08-100961-1.00017-7.
27. **GUEVARA, Katia**, *Efecto antibacteriano de tres concentraciones de látex de sangre de drago (Croton lechleri) sobre cepas de Streptococcus Mutans ATCC 25175, Chiclayo 2019*. . Pimentel, Perú : Universidad Señor de Sipán.
28. **GURTOVENKO, Andrey A. & ANWAR, Jamshed**, Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B*. Vol. 111, núm. 35, pp. 10453–10460. DOI 10.1021/jp073113e.
29. **HANSSEN, Hans-Peter & SCHMITZ, Markus**, Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Nut Oil and Its Therapeutic and Nutritional Uses. En : *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, pp. 991–994. Elsevier. DOI 10.1016/B978-0-12-375688-6.10117-3.
30. **HENKIN, R. I., LARSON, A. L. & POWELL, R. D.**, Hypogeusia, Dysgeusia, Hyposmia, and Dysosmia following Influenza-Like Infection. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. Vol. 84, núm. 5, pp. 672–682. DOI 10.1177/000348947508400519.
31. **HUDZICKI, Jan**, *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. . American Society for Microbiology. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol.
32. **HUGHES, Christopher V. & DEAN, Jeffrey A.**, Mechanical and Chemotherapeutic Home Oral Hygiene. En : *McDonald and Avery's Dentistry for the Child and Adolescent*, pp. 120–137. Elsevier. DOI 10.1016/B978-0-323-28745-6.00007-7.
33. **ILELEJI, Klein E et al.**, Comparison of Standard Moisture Loss-on-Drying Methods for the Determination of Moisture Content of Corn Distillers Dried Grains with Solubles. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. Vol. 93, núm. 3, pp. 825–832. DOI 10.1093/jaoac/93.3.825.
34. **JANG, Miran, YOU, SoHyeon & KIM, Gun-Hee, 2020a**. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf from Myanmar.

Korean Journal of Food Preservation. Vol. 27, núm. 6, pp. 781–790.
DOI 10.11002/kjfp.2020.27.6.781.

35. **JANG, Miran, YOU, SoHyeon & KIM, Gun-Hee, 2020b.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf from Myanmar. *Korean Journal of Food Preservation*. Vol. 27, núm. 6, pp. 781–790.
DOI 10.11002/kjfp.2020.27.6.781.
36. **JONES, Kenneth,** Revisión de la Sangre de Drago (*Croton lechleri*)-Una savia arbórea sudamericana para el tratamiento de la diarrea, inflamación, picaduras de insectos, infecciones virales y heridas: De los usos tradicionales a la investigación clínica. *The Journal of Alternative and Complementary medicine*. Vol. 9, núm. 6, pp. 877–896.
DOI 10.1089/107555303771952235.
37. **KINANE, Denis F., STATHOPOULOU, Panagiota G. & PAPAPANOU, Panos N.,** Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers 2017 3:1*. Vol. 3, núm. 1, pp. 1–14. DOI 10.1038/nrdp.2017.38.
38. **KODAHN, Nete & SORENSE, Marten,** Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Is an Underutilized Crop with a Great Potential. *Agronomy*. Vol. 11, núm. 6, p. 1066.
DOI 10.3390/agronomy11061066.
39. **KUKLINSKI, Claudia,** *Farmacognosia*. Omega. ISBN 8428211914. 1999.
40. **L, Elsa, SUPRIYANA, Supriyana & SUNARJO, Lanny,** The Potential of Lime Peel Extract Mouthwash as A Non-Pharmacological Preparation Inhibits Caries Bacteria. *Jurnal Health Sains*. Vol. 4, núm. 4, pp. 56–64. DOI 10.46799/jhs.v4i4.885.
41. **LAZO, José & PAREJA, María,** Extracto de *Croton lechleri* y de *Pelargonium robertianum* L. en el tratamiento de la gingivitis asociada al embarazo. *Kiru*. Vol. 4, núm. 2, pp. 52–60.
42. **LEE, Wonjong, WOO, Eun-Rhan & LEE, Dong Gun,** Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radical Research*. Vol. 50, núm. 12, pp. 1309–1318. DOI 10.1080/10715762.2016.1241395.

43. LEITE, Vanessa Maria Fagundes et al., In Vitro Antimicrobial Activity of an Experimental Dentifrice Based on Ricinus Communis. *Brazilian Dental Journal*. Vol. 25, núm. 3, pp. 191–196. DOI 10.1590/0103-6440201302382.
44. LEMOS, J A et al., The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiology spectrum*. Vol. 7, núm. 1. DOI 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
45. LIM, K. -S. & KAM, P.C.A., Chlorhexidine - Pharmacology and Clinical Applications. *Anaesthesia and Intensive Care*. Vol. 36, núm. 4, pp. 502–512. DOI 10.1177/0310057X0803600404.
46. ŁUKOMSKA, Monika, SOKOŁOWSKI, Jerzy & ŁAPINSKA, Barbara, Chlorhexidine – mechanism of action and its application to dentistry. *J Stoma*. Vol. 70, núm. 4, pp. 405–417.
47. MATOS, R & BASCONES, A, Tratamiento periodontal quirúrgico: Revisión. Conceptos. Consideraciones. Procedimientos. Técnicas. *Avances en Periodoncia* [en línea]. Vol. 23, núm. 3, pp. 155–170. Recuperado a partir de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852011000300002&lng=es&nrm=iso [consultado 11 noviembre 2023].
48. MAZU, Oliwia et al., Tap the sap - investigation of latex-bearing plants in the search of potential anticancer biopharmaceuticals. *Frontiers in plant science*. Vol. 13, p. 979678. DOI 10.3389/fpls.2022.979678.
49. MEHROTRA, Neha & SINGH, Saurabh, *Periodontitis* [en línea]. StatPearls Publishing; Periodontitis. Recuperado a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126/> [consultado 11 noviembre 2023].
50. MELETIADIS, Joseph et al., Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and *In Vitro* - *In Vivo* Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 54, núm. 2, pp. 602–609. DOI 10.1128/AAC.00999-09.

51. **MHD, Nur Anis Raihana & LEE, Lai Kuan**, Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis* L.): recent insight on phytochemistry, pharmacology, organoleptic, safety and toxicity perspectives. *Heliyon*. Vol. 8, núm. 9, p. e10572. DOI 10.1016/j.heliyon.2022.e10572.
52. **MIRANDA, Migdalia**, *Métodos de análisis de drogas y extractos*. Ciudad de la Habana, Cuba.
53. **MOHAMMADI, Zahed**, Chlorhexidine gluconate, its properties and applications in endodontics. *Iranian endodontic journal*. Vol. 2, núm. 4, pp. 113–25.
54. **MONTOPOLI, Monica et al.**, Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 144, núm. 3, pp. 747–753. DOI 10.1016/j.jep.2012.10.032.
55. **NARANJO, Andrea**, Prevalencia de enfermedad periodontal en escolares de 12 años de CHIQUINTAD CUENCA (Azuay, Ecuador). *Odontología Activa Revista Científica*. Vol. 4, núm. 1, pp. 1–6. DOI 10.31984/OACTIVA.V4I1.290.
56. **NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE [NIH]**. *Plukenetia volubilis*. *Plukenetia volubilis* [en línea]. Recuperado a partir de : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=316893> [consultado 11 noviembre 2023].
57. **NAZ, Rabia & BANO, Asghari**, Antimicrobial potential of Ricinus communis leaf extracts in different solvents against pathogenic bacterial and fungal strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 2, núm. 12, pp. 944–947. DOI 10.1016/S2221-1691(13)60004-0.
58. **NAZIR, Muhammad et al.**, Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*. pp. 1–8. DOI 10.1155/2020/2146160.
59. **NOEL, Daniel J., KEEVIL, C. William & WILKS, Sandra A.**, Synergism versus Additivity: Defining the Interactions between Common Disinfectants. *mBio*. Vol. 12, núm. 5, pp. e02281-21. DOI 10.1128/mBio.02281-21.
60. **NORMA, Alicia & ECHEVERRI, Isabella**, Sacha Inchi (*plukenetia volubilis* linneo): ¿una experiencia ancestral desaprovechada? Evidencias clínicas asociadas a su consumo.

Revista chilena de nutrición. Vol. 43, núm. 2, pp. 9–9. DOI 10.4067/S0717-75182016000200009.

61. **NOUR, Iman H. et al.**, Morphological, Anatomical and Chemical Characterization of *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae). *Agronomy*. Vol. 13, núm. 4, p. 985. DOI 10.3390/agronomy13040985.
62. **PAIS, Andrew L., LI, Xu & XIANG, Qiu-Yun**, Discovering variation of secondary metabolite diversity and its relationship with disease resistance in *Cornus florida* L. *Ecology and Evolution*. Vol. 8, núm. 11, pp. 5619–5636. DOI 10.1002/ece3.4090.
63. **PARK, Chang Ha et al.**, The Effect of Different Drying Methods on Primary and Secondary Metabolites in Korean Mint Flower. *Agronomy*. Vol. 11, núm. 4, p. 698. DOI 10.3390/agronomy11040698.
64. **PEKIC, B et al.**, Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry*. Vol. 61, núm. 1–2, pp. 201–206. DOI 10.1016/S0308-8146(97)00128-3.
65. **PERES, Marco A et al.**, Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*. Vol. 394, núm. 10194, pp. 249–260. DOI 10.1016/S0140-6736(19)31146-8.
66. **PIHLSTROM, Bruce L., MICHALOWICZ, Bryan S. & JOHNSON, Newell W.**, Periodontal diseases. *The Lancet*. Vol. 366, núm. 9499, pp. 1809–1820. DOI 10.1016/S0140-6736(05)67728-8.
67. **POLANIA, Nicole, GÓMEZ, Franci-Nathalie & HERNÁNDEZ, Indira**, *Determinación de la Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana de Extractos Obtenidos de las Cáscaras de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.)*. . Bucaramanga, Colombia: Universidad de Santander.
68. **POPPOLO, Frank & OUANOUNOU, Aviv**, Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *International Dental Journal*. Vol. 72, núm. 3, pp. 269–277. DOI 10.1016/j.identj.2022.01.005.
69. **RAMÍREZ, G**, Sangre de drago (Croton lechleri Muell. Arg). *Natura Medicatrix*. Vol. 21, núm. 4, pp. 213–217.

- 70. RATHEE, Manu & JAIN, Prachi**, *Gingivitis* [en línea]. StatPearls Publishing. Gingivitis. Recuperado a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557422/> [consultado 11 noviembre 2023].
- 71. RAUCH, Cyril & LEIGH, James**, Theoretical evaluation of wall teichoic acids in the cavitation-mediated pores formation in Gram-positive bacteria subjected to an electric field. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Vol. 1850, núm. 4, pp. 595–601. DOI 10.1016/j.bbagen.2014.12.004.
- 72. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA**, *Métodos de farmacognosia*. 3ª ed. Madrid: Secretaría General Técnica, Boletín Oficial del Estado.
- 73. RISCO, Ester et al.**, Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago. *Revista de Fitoterapia*. Vol. 5, núm. 2, pp. 101–114.
- 74. SANTOS, A.P.P., OLIVEIRA, B.H. & NADANOVSKY, P.**, Effects of Low and Standard Fluoride Toothpastes on Caries and Fluorosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Research*. Vol. 47, núm. 5, pp. 382–390. DOI 10.1159/000348492.
- 75. SHAJU, Jacob**, Global prevalence of periodontitis: A literature review. *International Arab Journal of Dentistry*. Vol. 3, núm. 1, pp. 26–30.
- 76. SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACIÓN TAXONÓMICA [ITIS]**. *Ricinus communis L.* DOI <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>.
- 77. SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACIÓN TAXONÓMICA [ITIS]**. *Croton lechleri Müll. Arg.* DOI <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>.
- 78. SOTLER, Robert**, Prooxidant Activities of Antioxidants and Their Impact on Health. *Acta Clinica Croatica*. Vol. 58, núm. 4, pp. 726–736. DOI 10.20471/acc.2019.58.04.20.
- 79. SUUBAAR, Jennifer, MOSOBIL, Richard & DONKOR, Addai-Mensah**, Antibacterial and antifungal activities and phytochemical profile of leaf extract from different extractants of *Ricinus communis* against selected pathogens. *BMC Research Notes*. Vol. 10, núm. 1, p. 660. DOI 10.1186/s13104-017-3001-2.

- 80. TADIN, Antonija et al.,** Oral Hygiene Practices and Oral Health Knowledge among Students in Split, Croatia. *Healthcare*. Vol. 10, núm. 2, p. 406. DOI 10.3390/healthcare10020406.
- 81. TALLARIDA, R. J.,** Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes & Cancer*. Vol. 2, núm. 11, pp. 1003–1008. DOI 10.1177/1947601912440575.
- 82. TENOVER, F.C.,** Antimicrobial Susceptibility Testing☆. En: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. DOI 10.1016/B978-0-12-801238-3.02486-7.
- 83. TSUDA, Hiromasa et al.,** Genes Involved in Bacitracin Resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 46, núm. 12, pp. 3756–3764. DOI 10.1128/AAC.46.12.3756-3764.2002.
- 84. VOLETI, Archana et al.,** Anti Bacterial Activity of Ricinus Communis Extracts against Common Human Pathogens Obtained from Surgical Wound Infections in a Tertiary Care Hospital of Semi-urban Set Up at Andhra Pradesh, India. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*. Vol. 16, núm. 2, pp. DC01–DC04. DOI 10.7860/JCDR/2022/51310.15970.
- 85. VRANIC, Edina et al.,** Formulation ingredients for toothpastes and mouthwashes. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. Vol. 4, núm. 4, pp. 51–58. DOI 10.17305/bjbms.2004.3362.
- 86. VYAS, Tarun et al.,** Chemical plaque control - A brief review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. Vol. 10, núm. 4, p. 1562. DOI 10.4103/jfmpe.jfmpe_2216_20.
- 87. WHO.** Oral health. [en línea]. Recuperado a partir de: https://www.who.int/health-topics/oral-health#tab=tab_1 [consultado 11 noviembre 2023 a].
- 88. WHO.** Oral health data portal. *Oral health data portal* [en línea]. Recuperado a partir de: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/oral-health-data-portal> [consultado 11 noviembre 2023 b].
- 89. WHO,** *Quality control methods for medicinal plant materials*. Tercera. Geneva: World Health Organization Geneva. ISBN 9241545100.

- 90. WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO] GENEVA,** Quality control methods for medicinal plant materials. En: *Quality control methods for medicinal plant materials*, pp. 1–122 [en línea]. WHO Library Cataloguing in Publication Data. ISBN 92 4 154510 0. Recuperado a partir de: https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/quality-control-methods-for-medicinal-plant-materials.pdf?sfvrsn=b451e7c6_0 [consultado 11 noviembre 2023].
- 91. WRONSKA, Natalia et al.,** The Synergistic Effect of Triterpenoids and Flavonoids—New Approaches for Treating Bacterial Infections? *Molecules*. Vol. 27, núm. 3, p. 847. DOI 10.3390/molecules27030847.
- 92. WU, Meishan & BROWN, Angela C.,** Applications of Catechins in the Treatment of Bacterial Infections. *Pathogens*. Vol. 10, núm. 5, p. 546. DOI 10.3390/pathogens10050546.
- 93. YEROVI, Natalia.** “EVALUACIÓN DEL EFECTO NEMATICIDA DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE TRES ESPECIES VEGETALES (Ricinus communis, Tagetes filifolia, Nicotiana tabacum) EN EL CANTÓN RIOBAMBA (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2018. pp. 1-89.
- 94. ZAYED, Sara Moataz et al.,** Biofilm formation by Streptococcus mutans and its inhibition by green tea extracts. *AMB Express*. Vol. 11, núm. 1, p. 73. DOI 10.1186/s13568-021-01232-6.
- 95. ZENG, Yan et al.,** Activity of quercetin and kaemferol against Streptococcus mutans biofilm. *Archives of Oral Biology*. Vol. 98, pp. 9–16. DOI 10.1016/j.archoralbio.2018.11.005.
- 96. ZHANG, Qing-Wen, LIN, Li-Gen y YE, Wen-Cai,** Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. Vol. 13, núm. 1, p. 20. DOI 10.1186/s13020-018-0177-x.

ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN O ADQUISICIÓN DE *R. communis*, *C. lechleri* Y *P. volubilis*.



ANEXO B: CONTROL DE CALIDAD DE *R. communis*, *C. lechleri* Y *P. volubilis*.

i. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA



i. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD



ii. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

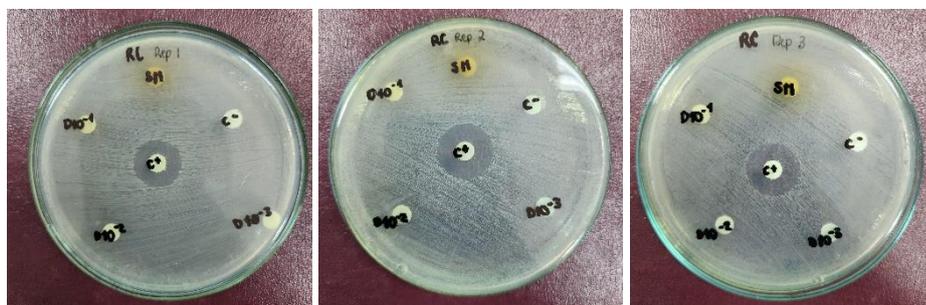


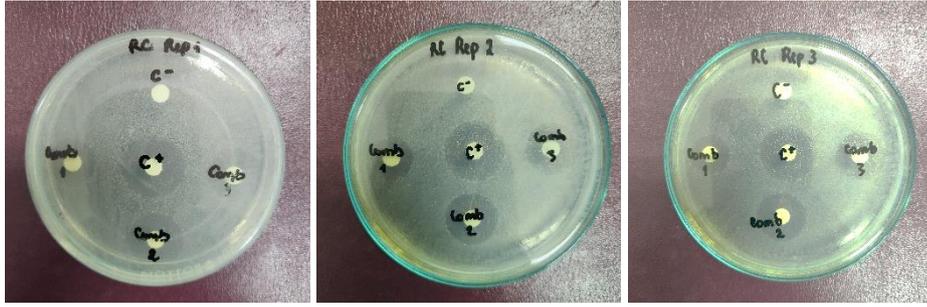
ANEXO C: MARCHA FITOQUÍMICA DE *R. communis*, *C. lechleri* Y *P. volubilis*.



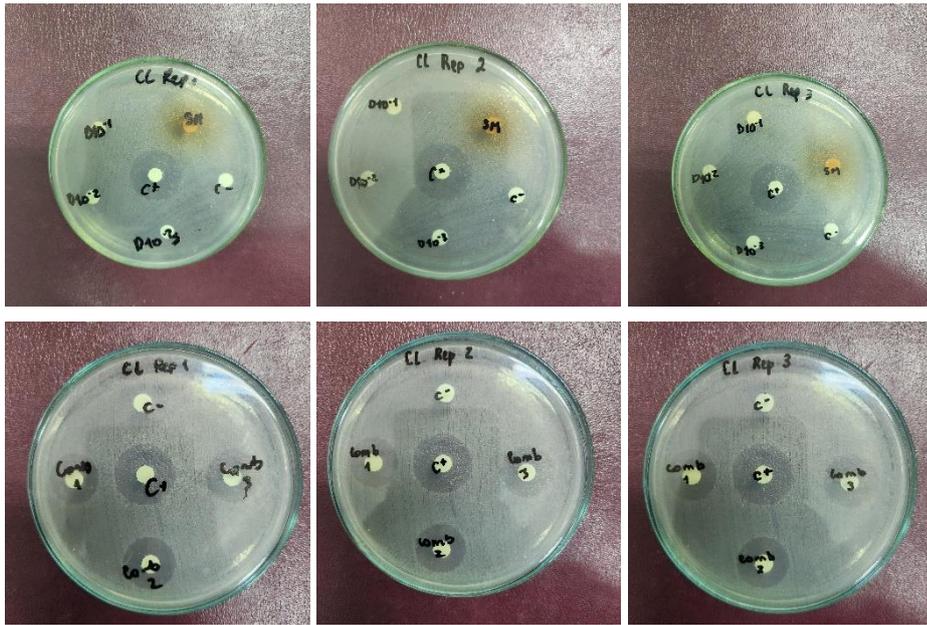
ANEXO D: RESULTADOS DE DIFUSIÓN EN DISCO Y COMBINACIONES

i. *R. communis*

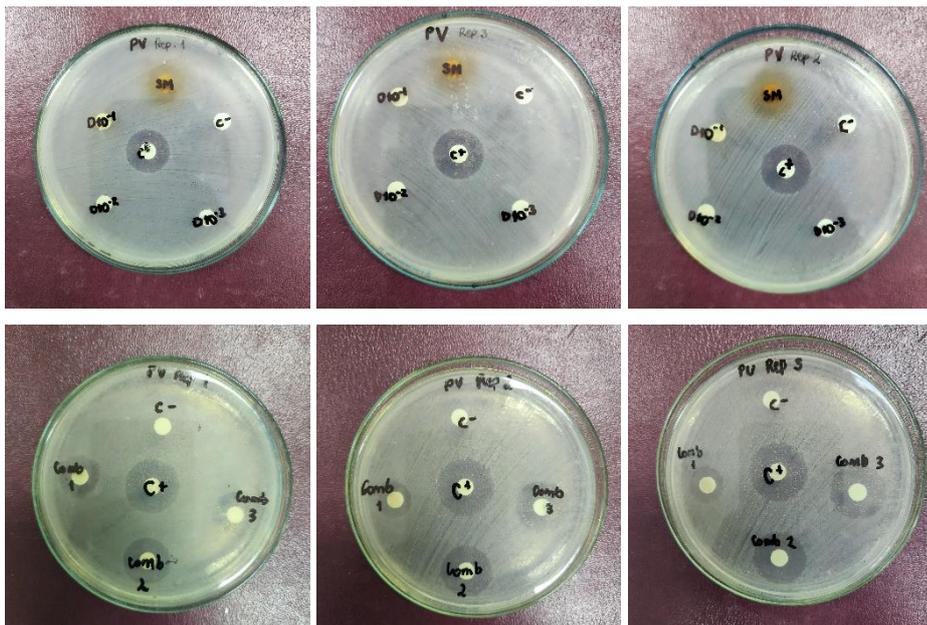




ii. *C. lechleri*



iii. *P. volubilis*



ANEXO E: AUTORIZACIÓN DE RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES DE ESPECIES VEGETALES



Ministerio del Ambiente, Agua
y Transición Ecológica

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 325

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAATE-ARSFC-2023-0325

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA INICIO	FECHA FIN
2023-12-21	2024-12-21

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

Plantae

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES /TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

Nº de C./Pasaporte	Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Nº REGISTRO SENESCYT	EXPERIENCIA	GRUPO BIOLÓGICO
0603914318	PILCO BONILLA GISELA ALEXANDRA	Ecuatoriana	1002-12-1135873	PRODUCTOS NATURALES	Magnoliopsida
1850030626	CHIMBO VEGA KATHERINE YAJAIRA	Ecuatoriana	NO APLICA	8 MESES	Magnoliopsida

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Estudio de la actividad antibacteriana in vitro de seis especies vegetales frente a Streptococcus mutans

7.- SE AUTORIZA LA RECOLECCION CON EL PROPOSITO DE:

Evaluar la actividad antibacteriana in vitro de seis especies vegetales frente a <i>Streptococcus mutans</i>
Determinar el halo de inhibición que cada una de las especies vegetales presenta frente a las cepas de interés
Determinar la actividad antibacteriana de las especies vegetales mediante un antibiograma y pruebas de sensibilidad.
Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en las especies mediante tamizaje fitoquímico.

8.- ÁREA GEOGRÁFICA QUE CUBRE LA RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES O ESPECÍMENES:

PROVINCIAS	SNAP	BOSQUE PROTECTOR
CHIMBORAZO	NA	NA

9.- INFORMACIÓN DE LAS ESPECIES A RECOLECTAR

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE	TIPO MUESTRA	N° MUESTRA	N° LOTE
Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Achillea	<i>Achillea millefolium</i>	Hojas	5	
Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Tanacetum	<i>Tanacetum parthenium</i>	hojas y flores	5	
Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	Plukenetia	<i>Plukenetia volubilis</i>	hojas	5	
Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	Ricinus	<i>Ricinus communis</i>	Hojas	5	
Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	Croton	<i>Croton lechleri</i>	Latex	1	

10.- METODOLOGÍA APLICADA EN CAMPO

FASE DE RECOLECCIÓN:	Se realizará la recolección de las especies vegetales teniendo en cuenta sus características físicas, evitando aquellas con signos de deterioro ambiental y deterioro por insectos. En la recolección se emplearán guantes, bolsas de recolección y tijeras estériles para la realización de cortes precisos e incisiones, según como corresponda.
FASE DE PRESERVACIÓN:	Se realizará el lavado de las hojas de las especies vegetales con agua destilada para retirar el material extraño y posteriormente se realizará secado a temperatura inferior a 40°C en estufas grado laboratorio.

11. METODOLOGIA APLICADA EN LABORATORIO

MÉTODOS EMPLEADOS EN EL LABORATORIO:	Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda Determinación de cenizas totales Determinación de cenizas solubles en agua Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico. Tamizaje Fitoquímico Aceites esenciales
---	--

12.- SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA RECOLECCION.

Grupo Biológico a Recolectar	Descripción	Tipo de Equipamiento
Magnoliopsida	MICROSCOPIO DE ALTA RESLUCIÓN	Equipo en Laboratorio
Magnoliopsida	REACTIVOS PARA TAMIZAJE, REVERBERO, TUBOS DE ENSAYO, SOLVENTES PARA PREPARACION DE EXTRACTOS	Material en Laboratorio

13.- COLECCIONES NACIONALES DEPOSITARIAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Magnoliopsida	Herbario Escuela superior Técnica del Chimborazo
---------------	--

14.- RESULTADOS ESPERADOS

Estudios previos realizados en numerosas especies vegetales de la familia Euphorbiaceae exhiben capacidad antibacteriana debido al rico perfil fitoquímico que posee, entre ellos, flavonoides, alcaloides, saponinas, glucósidos cardíacos, terpenoides, taninos, esteroides, fenoles y antroquinonas. Ricinus communis, el ejemplar a analizar, sugiere potencial actividad como bactericida por la alta presencia de taninos, flavonoides y terpenoides, responsables del debilitamiento del tejido membranoso y la inactivación de proteínas funcionales del microorganismo.

15.- CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO PARA LA TOMA DE DECISIONES A LA ESTRATEGIA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD 2011-2020.

METAS	DESCRIPCIÓN
Meta02.15.03Hasta 2017 se ha implementado dos (2) Centros de Bioconocimiento (CBDA) en provincias seleccionadas para la conservación de la agrobiodiversidad local.	El conocimiento de los metabolitos secundarios potenciará el uso de alternativas naturales a la medicina

DE ACUERDO A LAS SIGUIENTES ESPECIFICACIONES

1. Solicitud de: **PILCO BONILLA GISELA ALEXANDRA**

2. Institución Nacional Científica : **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

3. Fecha de entrega del informe final o preliminar: **2024/12/06**
4. Valoración técnica del proyecto: **LATORRE HURTADO ERIKA GABRIELA**
5. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS.**
6. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS**, sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.
7. Los especímenes o muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN, NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO.**
8. Los resultados que se desprendan de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

OBLIGACIONES DEL/ LOS INVESTIGADOR/ES.

9. Ingresar al sistema electrónico de recolecta de especímenes de especies la diversidad biológica del ministerio del ambiente y agua, el o los informes parciales o finales en formato PDF, en el formato establecido.

Con los siguientes anexos:

- Escaneado de el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las Colecciones Científicas Ecuatorianas como Internacionales depositarias de material biológico.
 - Escaneado de las publicaciones realizadas o elaboradas en base al material biológico recolectado.
 - Escaneado de material fotográfico que considere el investigador pueda ser utilizados para difusión. (se mantendrá los derechos de autor).
10. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos el número de Autorización de Recolección otorgada por el Ministerio del Ambiente y Agua, con el que se recolecto el material biológico.
 11. Depositar los holotipos en una institución científica depositaria de material biológico.
 12. Los holotipos solo podrán salir del país en calidad de préstamo por un periodo no más de un año.

13. Las muestras biológicas a ser depositadas deberán ingresar a las colecciones respectivas siguiendo los protocolos emitidos por el Curador/a custodio de los especímenes.

14. Las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se responsabiliza a **PILCO BONILLA GISELA ALEXANDRA.**

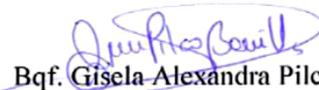
DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
VILLAVICENCIO GAIBOR RICARDO JAVIER
2024-03-13





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 09/ 07 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Mayerli Lisseth León Garófalo
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
<p style="text-align: center;"> Bqf. Gisela Alexandra Pilco Bonilla Directora del Trabajo de Integración Curricular</p> <p style="text-align: center;"> Bqf. Aida Adriana Miranda Barros Asesora del Trabajo de Integración Curricular</p>