



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
ESTOMATOLOGÍA**

**TESIS**

**COMPARACIÓN DEL EFECTO  
ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL EXTRACTO  
ACUOSO E HIDROETANÓLICO DE HOJAS DE  
*Moringa oleifera* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC  
35668**

**PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**Autora:**

**CHERO CHICLAYO VANESSA ROSMERY**

**Asesor:**

**Ms. Esp. C.D. César Abraham Vásquez Plasencia**

**Línea de Investigación:**

**Respuestas biológicas en terapias estomatológicas**

**Pimentel – Perú  
2018**

**Comparación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso e hidroetanólico de hojas de *moringa oleifera* sobre *streptococcus mutans* atcc 35668**

**Aprobación de informe de investigación**

---

**Ms. Esp. CD. César Abraham Vásquez Plasencia**

**Asesor metodólogo**

---

**Dra. Clara Luisa Henckel Sime**

**Presidente del jurado de tesis**

---

**Dr. Juan Pablo Portocarrero  
Mondragón**

**Secretario del jurado de tesis**

---

**Dra. Paola Beatriz La Serna Solari**

**Vocal del jurado de tesis**

## DEDICATORIA

A mi adorada Madre Martina Chiclayo Hernández por su inmenso y dedicado sacrificio que me sirven de ejemplo, para poder lograr mis metas trazadas.

A mi adorado Padre Jesús Chero Cobeñas por haber inculcado a sus hijos, valores morales y saber valorar el sacrificio de ellos.

A mis queridos hermanos Ruddy Chero Chiclayo, Anderson Chero Chiclayo y familia, por su alentadora inspiración, su comprensión y por que siempre estarán a mi lado cuando los necesite.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi Asesor y profesor Ms. Esp. CD. César Abraham Vásquez Plasencia quién me dio la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo por compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

El jurado integrado por la Dra. Henckell Sime Clara Luisa del Carmen, el Dr. CD. Juan Pablo Portocarrero Mondragón y la Dra. CD. Paola La Serna Solari por sus correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

Los profesores Ms. Esp.CD. César Abraham Vásquez Plasencia y MSc. Blgo. Pérez Delgado Orlando por la orientación en la parte investigativa, y como ejemplo de imagen docente en sus enseñanzas en mi formación de pregrado.

A mis amigos quienes sin estar involucrados directamente, me dieron su apoyo para seguir adelante.

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso e hidroetanólico de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Se evaluó el efecto en 6 grupos distribuidos en concentraciones de 76 mg/mL, 38 mg/mL y 19 mg/mL para cada tipo de extracto. Se hicieron 8 repeticiones por grupo experimental. La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante el método de difusión en pozo. El espécimen bacteriano fue reactivado en caldo nutritivo, para inocularlo en cultivo Agar Cerebro Corazón. Al enfrentar el microorganismo a los extractos hidroetanólicos, se obtuvo halos promedios de inhibición de 17,96 y 15,27 mm para las concentraciones de 76 mg/ml y 38mg/ml; sin embargo, los extractos acuosos no presentaron halos de inhibición. Se concluye que los extractos hidroetanólicos de 76mg/ml y 38mg/ml tienen efecto antibacteriano sobre *S. mutans* ATCC 35668

**Palabras clave:** *Streptococcus mutans*, *Moringa oleífera*, Extractos (**Fuente:** DeCS BIREME)

### **Abstract**

The research objective was to compare the in vitro antibacterial effect of the aqueous and hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves on *Streptococcus mutans* ATCC 35668. The effect was evaluated in 6 groups distributed in concentrations of 76 mg/mL, 38 mg/mL and 19 mg/mL for each extract. There were 8 repetitions per experimental group. The bacterial sensitivity was evaluated by the well diffusion method. The bacterial specimen was reactivated in nutritious broth, to inoculate it in heart agar culture. When facing the microorganism to the hydroethanolic extracts, average inhibition halos of 17,96 and 15,27 mm were obtained for the concentrations of 76 mg/mL and 38 mg/mL; however, the aqueous extracts did not show inhibition haloes. It is concluded that the hydroethanolic extracts of 76 mg/mL and 38 mg/mL have antibacterial effect on *S. mutans* ATCC 35668

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, *Moringa oleifera*, *Extracts* (Source: MeSH NLM)

## INDICE

Aprobación de informe de investigación.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Realidad Problemática:.....	2
1.2 Trabajos previos.....	4
1.3 Teorías relacionadas al tema.....	7
1.4 Formulación del Problema.....	24
1.5 Justificación e importancia del estudio:.....	24
1.6 Hipótesis.....	24
1.7 Objetivos.....	24
1.7.1 Objetivo General.....	24
1.7.2 Objetivos Específicos.....	25
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
2.1 Tipo y Diseño de Investigación.....	26
2.2 Población y muestra.....	26
2.3 Variables, Operacionalización.....	27
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	27
2.5 Procedimiento para la recolección de datos.....	27
2.6 Procedimientos de análisis de datos.....	30
2.7 Aspectos éticos.....	30
2.8 Criterios de rigor científico.....	30
III. RESULTADOS.....	31
3.1 Tablas y Figuras:.....	31
3.2 Discusión de resultados.....	36
IV. CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40
Anexos.....	43

## I. INTRODUCCIÓN

Los principales problemas de caries son dos especies de "estreptococos"; *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. *Lactobacillus* y *Actinomyces* también se encuentran asociados con la caries dental. *Actinomyces odontolyticus* coloniza a los niños antes de que los dientes erupcionen. Algunas lesiones de caries en las raíces están relacionadas a *Actinomyces naeslundii*, *A. israelii* y *A. gerencseriae* (1).

A nivel nacional según el Estudio Epidemiológico realizado en 2001-2002, la prevalencia de caries dental es de 90.4%; en lo que se refiere a caries dental el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (CPOD), a los 12 años es de aproximadamente 6, ubicándose según la Organización Panamericana de la Salud – OPS en un País en estado de emergencia (2).

Incluso el resultado de la enfermedad también se ve afectado por los factores del huésped, la ingesta dietética, las bacterias cariogénicas y otros microbios. Los *Streptococcus mutans* metaboliza la sacarosa para inducir la formación de biofilm en la superficie del diente, produciendo ácido láctico para degradar el esmalte. (3)

Por otra parte, algunos experimentos han determinado que los extractos de plantas tienen actividad antibacteriana *in vitro* contra diferentes cepas de importancia en salud, sin embargo, su efecto es dependiente de las especie de plantas estudiadas y bacterias ensayadas, por lo que se informa que, extractos etanólicos, metanólicos, acuosos de *Moringa oleifera* tienen actividad antibacteriana contra bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* (4) e informan efecto antibacteriano contra cepas *Streptococcus mutans* (MTCC 890) y *Streptococcus mutans* (MTCC 497) (5).

Esto motivó a esta interrogación ¿Cuál es la diferencia entre el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso e hidroetanólico de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668?. Dependiendo del tipo de extracto y sus concentraciones, el efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668, pueden variar. El propósito de este estudio fue comparar el efecto antibacteriano *in*



*vitro* del extracto acuoso y extracto hidroetanólico de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668, mediante el método de difusión en pozo.

### **1.1 Realidad Problemática:**

La caries dental se define como la destrucción localizada del diente causada por la descalcificación del esmalte, seguido por lisis enzimática de las estructuras orgánicas y que lleva a la formación de cavidades. Si no se controla, la cavidad puede penetrar en el esmalte, la dentina y alcanzar la pulpa (6).

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades orales más comunes son la caries, las afecciones periodontales (de las encías), el cáncer oral, las enfermedades infecciosas de la boca, los traumatismos físicos y las lesiones congénitas. Entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y alrededor del 100% de los adultos tienen caries dentales, generalmente acompañada de dolor o molestias (7).

Hoy en día, la incidencia de caries dental en los ancianos en los Estados Unidos y en otros lugares está aumentando a medida que la población de ancianos conserva más dentición, permitiendo que se usen más superficies dentales para los procesos de enfermedad. Los Estados Unidos han demostrado que el 45% de los niños entre las edades de 5 a 17 años se ven afectados por la caries dental y el problema es particularmente grave entre los niños en poblaciones específicas (1). La ocurrencia de esta enfermedad es más frecuente en los países de América Latina, Medio Oriente, países del sur de Asia, al menos extendido en China. (8)

Por otra parte, un estudio de un grupo de niños árabes, mostró prevalencia de caries dental en un 73% (n = 711) en dientes primarios y permanentes. Entre los 6 - 9 años, la prevalencia de caries fue de aproximadamente el 78% (n = 397), y entre los 10 - 12 años de edad, fue de aproximadamente el 68% (n = 314). Por tanto los hábitos de higiene oral influenciará en la reducción caries dental (9).

Según el último informe oficial presentado por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) en el 2005. Los resultados mostraron que la prevalencia de caries dental en

la población escolar promediaba el 90%. La tasa de prevalencia urbana fue de 90,6% y la tasa de prevalencia rural 88,7%. A nivel nacional, el promedio de piezas cariadas, perdidas y obturadas en la dentición temporal y permanente (índice ceo-d/ CPO-D) fue de 5,84 y el promedio de piezas cariadas, perdidas y obturadas en la dentición permanente para la edad de 12 años (CPO-D-12) fue de 3,67 (IC95%: 3,37-3,97). Estos datos provienen de muestras de 7,730 niños en edad escolar en los 24 departamentos del Perú. De acuerdo con los estándares de la Organización Mundial de la Salud, los examinadores fueron capacitados y calibrados (10).

La caries dental en los dientes temporales se ha estudiado ampliamente en muchos países del mundo porque se sabe que es una de las enfermedades bucales más comunes en niños con síndrome de Down (11,12). Además, la interacción de las comunidades microbianas en la salud y la patogénesis de las caries no se conocen del todo, por lo que se concluye que las bacterias orales pueden transferirse a otras partes del cuerpo humano, dando lugar a enfermedades sistémicas como enfermedad coronaria (13). Además, los resultados de otros estudios mostraron una correlación entre el aislamiento de cepas de *S. mutans* de la cavidad oral y los niveles de proteína urinaria en pacientes con enfermedad renal, especialmente aquellos con un alto estado de caries dental (14).

Por lo tanto, bacterias Gram-positivas tales como *Streptococcus mutans* residen en la boca humana y, más específicamente, en las biopelículas multiespecíficas en la superficie de los dientes, a lo largo de las cuales se consideran como los principales microorganismos cariogénicos, el resultado de su capacidad para producir grandes cantidades de glucanos, así como ácido, superando la capacidad de amortiguación de la saliva, lo que da ventaja a las bacterias para competir con especies comensales no cariogénicas en entornos de pH bajo (15).

Previamente, esto se dividió en tres serotipos C, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos, que se caracterizan por su presencia a nivel bucal y sobre todo por su capacidad cariogénica, además, recientemente se designó una cepa de *S. mutans* con serotipo no c/e/f como serotipo k que se caracteriza por su bajo nivel de cariogenicidad debido a las alteraciones de varios de antígenos proteicos de superficie (16).

## 1.2 Trabajos previos

Rao *et al.* (2011). El propósito de este estudio fue determinar la actividad antibacteriana del extracto de metanol de *Moringa oleifera*. Las partes aéreas del material vegetal se recolectaron en el campus universitario de Andhra, Visakhapatnam, se secaron al aire y se extrajeron con metanol. El extracto seco se volvió a disolver en metanol para dar una solución de 100 mg/ml que luego se filtró. El extracto inhibió a *Streptococcus mutans* (MTCC 890), *Streptococcus mutans* (MTCC 497), *Streptococcus salivarius* (MTCC 1938), *Streptococcus mitis* (MTCC 2696), *Lactobacillus fermentum* (MTCC 903), *Streptococcus anginosus* (MTCC 1929), *Streptococcus gordonii* (MTCC 2695), *Lactobacillus acidophilus* (MTCC 447) y *Staphylococcus aureus* (MTCC 96). El efecto más significativo se encontró contra *S. aureus*, que son patógenos orales importantes. Una extracción biogúidica y el fraccionamiento del extracto metanólico de la hoja de *M. oleifera* proporcionó sitastiról, Niazinina A, estigmasterol, Kaempferol-3-o-β-D-glucopiranosido y quercetina-3-o-β-D-glucopiranosido. Todos los compuestos aislados de *M. oleifera* fueron activos contra *Streptococcus mutans* (MTCC 497), *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Lactobacillus acidophilus* (5).

Abdulkadir *et al.* (2015), El objetivo de este trabajo fue investigar las composiciones fitoquímicas y las actividades antimicrobianas *in vitro* del extracto etanólico de *Moringa oleifera* Lam, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El perfil fitoquímico y pruebas antimicrobianas de extractos de etanol de *Moringa oleifera* utilizaron en los procedimientos farmacognósticos básicos y ensayo de difusión de pozos. Se detectaron alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos en todos los extractos, con excepción de la raíz que carecía de saponinas y de las semillas que no contenían taninos. El ensayo de difusión de pozos de agar mostró que los extractos de *M. oleifera* mostrò actividades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron (25 mg/ml y 50 mg/ml para la raíz), (100 mg/ml para la semilla) y (50 mg/ml y 100 mg/ml para la vaina) contra estos tres microorganismos. Los extractos de hojas fueron activos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

pero no sobre *Candida albicans*. Los extractos de hojas tuvieron la mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias de evaluadas (12 mm a 50 mg/ml) mientras que el extracto de corteza tuvo la actividad mas baja (8 mm a 50 mg/ml). Sin embargo, sólo el extracto de vaina mostró una actividad antifúngica significativa (10 mm a 50 mg/ml) mientras que otros extractos a la misma concentración, no mostraron actividad antifúngica. Los resultados de este estudio indicaron que los extractos de etanol de *Moringa oleifera* Lam mostraron actividades antimicrobianas significativas en los patógenos evaluados (4).

Amabye y Tadesse (2016), el propósito de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*. También se llevó a cabo análisis fitoquímicos de la hoja en solventes de polaridad variable con etanol acuoso. El perfil fitoquímico indicó la presencia de flavonoides, taninos, esteroides, alcaloides, saponinas, en ambos extractos se utilizaron el método de difusión de pozos para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos en microorganismos. El extracto etanólico y acuoso fue activo contra todas las cepas pero el extracto de hoja de etanol mostró una actividad máxima contra *Streptococcus mutans* y el extracto acuoso mostró una actividad máxima contra *Proteus vulgaris*. La investigación mostró que el mayor poder reductor del extracto acuoso podría ser debido a la mejor solubilidad de los componentes antioxidantes en agua mientras que la actividad antibacteriana predominante en extractos de disolvente orgánico en comparación con extractos acuosos indica que los componentes activos responsables de la actividad bactericida son más solubles en solventes orgánicos. Estos estudios proporcionan evidencia para apoyar los usos medicinales de planta (17).

Elgamily *et al.* (2016), Para formular los remedios dentales naturales de *Moringa oleifera*, se usaron diferentes métodos de extracción para evaluar el potencial antibacteriano y antifúngico de diferentes partes de esta planta. Se prepararon tres extractos de solventes (Etanol, acetona y acetato de etilo) de diferentes partes de la *Moringa egipcia* y se probaron sobre patógenos orales: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* utilizando el método de difusión en disco;

Además de incorporar el extracto vegetal para formular pasta dental y enjuague bucal experimental. Los dos remedios dentales se evaluaron frente a las mismas cepas microbianas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de un solo factor para comparar el diámetro de la zona de inhibición y la prueba T. Los extractos de etanol de hojas demostraron los valores altamente significativos de zonas de inhibición ( $P \leq 0.05$ ) en el crecimiento de cepas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. Sin embargo, ninguno de los extractos mostró zona inhibitoria contra *Candida albicans*. Para los remedios dentales, la pasta dentífrica experimental exhibió una inhibición más alta que el enjuague bucal contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y sólo la pasta dentífrica reveló efecto antifúngico contra *Candida albicans*. En resumen, los diferentes extractos de diferentes partes de *Moringa oleífera* mostraron efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. La nueva pasta dental de extractos etanólicos de hojas, tuvieron efectos antibacterianos y antifúngicos en todas las cepas seleccionadas (18)

Khulood, Suha y Nada (2016), Realizaron un estudio con el propósito de comparar la actividad antimicrobiana *in vitro* entre el extracto acuoso de *Moringa oleífera* y el Gluconato de Clorhexidina. Las hojas de la planta de *Moringa oleífera* fueron recolectadas del Colegio de Farmacia; Bagdad, Irak. Los microorganismos (bacteriano y fúngico) probados se aislaron a partir de diferentes muestras clínicas. La actividad antimicrobiana *in vitro* se llevó a cabo por el método de difusión de pozos de agar en medio de agar Muller Hinton. El extracto acuoso de *Moringa* tiene efecto antibacteriano contra los organismos ensayados: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* y *Enterococcus faecalis*. El extracto acuoso mostró una mayor zona de inhibición sobre *S. aureus*. Y como conclusión tenemos que, la *Moringa olifera* puede usarse como agente antimicrobiano vegetal seguro y de bajo costo (19).

Al\_husnan y Alkahtani (2016), Realizaron un estudio para evaluar el extracto acuoso de la planta de *Moringa* contra bacterias que incluyen *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus cloacae*, *Salmonella typhi* y *Proteus vulgaris*. Los extractos de *Moringa*

mostraron un impacto en el crecimiento de bacterias en la sangre con una zona inhibitoria variable de  $23,5 \pm 0,45$  a  $12,5 \pm 0,50$  mm según el tipo de bacteria. Los porcentajes medios de inhibición del crecimiento fueron de  $85,9 \pm 0,42$  a  $65,3 \pm 0,34$  mm contra todas las bacterias ensayadas. En cuanto a hongos, los extractos mostraron una potencia moderada con zonas inhibitorias de 10 mm y 9 mm. Los resultados indicaron que el extracto acuoso de Moringa varió su actividad antifúngica de alto ( $18 \pm 0,54$  mm), moderado ( $13,2 \pm 0,58$  mm) y bajo ( $6,6 \pm 0,47$  mm). Así, el extracto acuoso de hojas de Moringa mostró actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y levaduras probados a diferentes concentraciones (20).

Othman y Ahmed (2017), Este estudio se realizó con el propósito de evaluar el potencial de los extractos de *M. oleifera* y *C. sinensis* sobre las bacterias multidroresistentes (MDR) y la reevaluación de la susceptibilidad a los antibióticos después del tratamiento con hierbas. También se relaciona con la detección de compuesto activos presentes en el extracto y su modo de acción sobre células bacterianas. Se identificaron bioquímicamente treinta cepas clínicas de *E. coli* y *S. aureus*. Los aislamientos resistentes a múltiples fármacos se identificaron mediante pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Se prepararon varias concentraciones a partir de los extractos de *M. oleifera* y *C. sinensis* y se aplicaron a los aislamientos seleccionados. Los cinco aislados fueron MDR. Se realizaron estudios adicionales, uno Gram-positivo y uno Gram-negativo. El extracto de etanol de *Moringa oleifera* y *C. sinensis* mostró efecto de inhibición con valores de CMI que oscilaban entre 10-20 mg mL<sup>-1</sup> y una CMB entre 30-40 mg mL<sup>-1</sup>. El cultivo de los dos aislamientos que mostraron la CMI del extracto de *M. Oleifera* presentaron sensibilidad a los antibióticos analizados, teniendo un efecto más significativamente sobre *E. coli* MDR. Las características fitoquímico revelaron una serie de compuestos biologicamente activos que pueden tener un efecto directo sobre la morfología celular (21).

### **1.3 Teorías relacionadas al tema**

#### **Caries dental**

##### **Etiología de la caries**

Históricamente, los investigadores se han concentrado en los efectos dietéticos y biológicos en la salud oral de los niños para explicar el desarrollo de la caries dental.

En los últimos años, los resultados de salud oral de los niños utilizan un marco más amplio, que incluye predictores psicosociales y ambientales, así como los efectos biológicos y dietéticos. Estos marcos generalmente clasifican las afecciones asociadas con enfermedades en cinco dominios amplios: genética y biología, entorno social, entorno físico, comportamientos que influyen en la salud y atención médica. Estas variables explican por qué algunos niños, desarrollan lesiones cariosas a pesar del uso de flúor y una gran cantidad de información sobre la prevención de la caries.

El modelo de caries de Fisher-Owens y colaboradores incorpora diferentes niveles del entorno que pueden afectar el desarrollo de la caries: nivel infantil; nivel familiar; y a nivel comunitario (22).

### **Nivel de niño**

Las placas visibles, la colonización temprana por bacterias asociadas con la caries dental, la presencia de estreptococos mutans, la ingesta frecuente de bebidas azucaradas, el cepillado dental poco frecuente, la enfermedad y el uso de antibióticos están asociados con el desarrollo de caries dental en la infancia (22).

### **Nivel familiar**

Las características familiares relacionadas con el riesgo de caries dental en los niños incluyen factores demográficos de la familia, comportamientos y actitudes de salud bucal parental, ansiedad dental y asistencia dental, salud materna y estilos de vida en la gestación y la primera infancia (22)

### **Nivel comunitario**

La salud bucal de los niños puede ser mejor en una comunidad que valora la buena salud oral. Los aspectos culturales y las comunidades pueden tener un impacto en el desarrollo de la caries dental. . Los sistemas de atención dental disponibles pueden afectar la salud oral y el desarrollo de caries en niños en edad preescolar (22).

### **Patogénesis de la caries dental**

La causa de la caries dental incluye tres factores: huésped, bacteria y dieta. La caries dental ocurre cuando la superficie dental susceptible está colonizada por bacterias cariogénicas y existe una fuente dietética de sacarosa o azúcar refinada. Los patógenos bacterianos producen ácido láctico por la fermentación de carbohidratos y este ácido

disuelve la estructura cristalina de la hidroxiapatita del diente que causa caries dental (22).

### **La conexión de sacarosa relacionada con la caries**

La sacarosa es un importante factor ambiental para la caries dental porque muchos estreptococos orales tienen enzimas extracelulares capaces de escindir enlaces glicosídico  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de sacarosa y utilizar la energía para producir polímero de glucosa (glucanos y mutans) y fructosa. Este grupo de enzimas llamadas glucosiltransferasas (GTF) explica esta relación particular entre sacarosa y caries dental. La formación de polímero glucano-mutan permite que las bacterias cariogénicas se acumulen en la biopelícula para formar una masa crítica. Sin formación de masa crítica, las bacterias cariogénicas colonizarían la cavidad oral pero no se acumularían para causar la destrucción de la superficie del esmalte. Por lo tanto, la formación de masas críticas asociadas de manera única con las glucosiltransferasas y la sacarosa es una causa biológica de la reciente aflicción de personas con caries (22).

### **Etapa de punto blanco**

El ácido producido por las bacterias y la levadura en la placa dental disuelve la matriz mineral de los dientes. En la etapa temprana, la caries dental aparece como mancha blanca y calcárea en los dientes (22).

En esta etapa, la superficie está intacta y las lesiones subsuperficiales son reversibles. Las manchas blancas producidas por caries incipientes pueden ser difíciles de distinguir de hipocalcificación del desarrollo. Además, la mancha blanca se convierte en una etapa de tinción negra. Si el mineral continúa perdiéndose debido a la exposición ácida, la superficie finalmente se rompe o "cavita" y la lesión no se puede revertir. Si la lesión se desarrolla, se puede perder una gran área del diente. Las lesiones cavitadas activas generalmente son de color dorado. Las lesiones de larga duración son más oscuras, a veces casi negras. La profundidad del color no es un buen indicador de la gravedad de la lesión ya que la caries detenida suele ser la más oscura (22).

### **Fisiopatología**

#### **Esmalte**

La desmineralización del esmalte por caries dental sigue la dirección de las varillas del esmalte, los distintos patrones triangulares entre fosa, fisura y las caries de



superficie lisa se desarrollan en el esmalte. Cuando el esmalte pierde minerales, el esmalte forma varias zonas distintas: zona translúcida, oscuras, cuerpo de la lesión y de la superficie. La zona translúcida coincide con 1/2% de pérdida de minerales. La oscura es una leve remineralización del esmalte. La mayor desmineralización y destrucción se encuentra en el cuerpo de la lesión. La zona de superficie permanece relativamente mineralizada hasta que la pérdida de la estructura denta conduce a una cavitación (22).

### **Dentina**

En la dentina es una capa más profunda al esmalte, las diferentes zonas afectadas por caries son el frente de avance, el área de infiltración de bacterias, y la área de destrucción. El frente de avance representa una zona de dentina desmineralizada debido al ácido y no hay bacterias presentes. Las zonas de penetración y destrucción bacteriana es la ubicación de bacterias invasoras y, en última instancia, es la descomposición de la dentina. La zona de destrucción tiene una población bacteriana más mixta donde las enzimas proteolíticas destruyen la matriz orgánica (22).

### **Cemento**

La incidencia de caries cemental aumenta en el adulto mayor a medida que se produce una depresión gingival por traumatismo o enfermedad periodontal. Es una enfermedad crónica que forma una lesión grande y poco profunda e invade lentamente el cemento de la raíz y luego invade la dentina para causar una infección crónica de la pulpa (22).

### **Signos y síntomas de caries dental**

Los signos y síntomas de la caries dental varían según su rango y ubicación. Cuando una cavidad acaba de comenzar y puede no tener ningún síntoma. A medida que la descomposición aumenta, causa signos y síntomas como:

- Dolor leve a agudo al comer o beber algo dulce, caliente o frío llamado sensibilidad dental.
- Agujeros u hoyos visibles en los dientes.
- Mancha marrón, negro o blanco en cualquier zona de una pieza dentaria.
- Halitosis y mal gusto.
- Fiebre, escalofríos, abscesos y trismo ([www.rightdiagnosis.com](http://www.rightdiagnosis.com)).

## **Complicaciones**

- La trombosis del seno cavernoso y la angina de Ludwig pueden ser mortales.
- Dolor de dientes, pulpitis, pérdida de dientes y decoloración dental

## **Diagnóstico de caries dental**

### **Diagnóstico primario**

Inicialmente puede aparecer como un área calcárea pequeña (caries de superficie lisa) que eventualmente puede convertirse en una gran cavitación. Inspección de todas las superficies visibles de los dientes usando una buena fuente de luz, espejo dental y explorador. Las radiografías dentales (rayos X) se usan para áreas menos visibles de los dientes, en particular caries entre los dientes. Los láseres sin radiación ionizante también ahora se usan para la detección de caries interproximal (entre los dientes). La inspección visual y táctil junto con las radiografías se empleó con frecuencia entre los dentistas, en particular para diagnosticar caries de fosas y fisuras. La caries temprana y no cavitada a menudo se diagnostica al soplar aire a través de la superficie sospechosa, lo que elimina la humedad y cambia las propiedades ópticas del esmalte no mineralizado (22).

### **Diagnóstico diferencial**

La fluorosis dental y los defectos del desarrollo del diente, incluida la hipomineralización del diente y la hipoplasia del diente, se utilizan para la caries dental (22).

## **Modelo Teórico Celular de *Streptococcus mutans***

La teoría celular propuesta por los alemanes Theodor Schwann y Matthias Schleiden, ha podido ayudar a la comprensión de los organismos y microorganismos con respecto a su morfoloía, fisiología y genética. Por tal motivo en el artículo consultado de *Streptococcus mutans* y caries dental de Ojeda, Oviedo y Salas (16).

## **Historia de la investigación de *S. mutans***

En 1924, J. Clarke aisló un organismo de las lesiones cariosas y lo llamó *S. mutans*, porque pensó que las células de forma ovalada observadas eran formas mutantes de estreptococos. Sin embargo, fue solo a fines de la década de 1950 que *S. mutans* recibió mayor atención de la comunidad científica y, a mediados de la década de 1960, se reconoció como un importante agente etiológico en la caries dental. (23).

### **Morfología y Fisiología de *Streptococcus mutans***

*Streptococcus mutans* es un coco Gram positivo, en cadena, no móvil, catalasa negativo, que produce rápido de ácido láctico, capaz de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco (16).

Por lo general, no producen hemólisis o decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de oveja, aunque se han informado unas pocas cepas hemolíticas. *S. mutans* se ha subclasificado en varios tipos basado en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la boca del ser humano. En cavidad bucal, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente y también puede recuperar en lesiones cariosas. A menudo puede aislarse de las heces en humanos y ratas. Aunque *S. mutans* no está ampliamente distribuido en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Del mismo modo se ha aislado en ratas y hámsteres experimentales (16)

### **Clasificación de *Streptococcus mutans***

Con base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, estreptococos del grupo mutans se pueden clasificar en 8 serotipos: *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k), *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *Streptococcus rattus* (serotipo b), *Streptococcus ferus* (serotipo c), *Streptococcus macacae* (serotipo c) y *Streptococcus downei* (serotipo h). Se sabe que el serotipo c de *S. mutans* es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, f y k (16).

Los polisacáridos de la pared celular juegan un papel importante en la colonización de sus nichos ecológicos. Las diferencias en las afinidades para la unión de los antígenos de polisacáridos a los tejidos humanos pueden ser la causa de esta distribución tan variada. Por otro lado, se cree que el progenitor de *S. mutans* haya sido el serotipo c y que las cepas f y e pueden haberse originado por mutaciones del determinante del serotipo c (16).

*Streptococcus mutans* generalmente es conocido como patógeno dental e igualmente se considera que causa bacteremia y endocarditis infecciosa.

Previamente se ha clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Recientemente se designó una cepa de *S. mutans* con serotipo no c/e/f como serotipo k el cual se caracteriza por una drástica reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa. Un rasgo biológico común del serotipo k es su bajo nivel de cariogenicidad debido a las alteraciones de varios de los mayores antígenos proteicos de superficie (16).

En cuanto a la virulencia en sangre, estas cepas sobreviven en la sangre por mayor tiempo debido a su baja antigenicidad. Otros estudios revelan la participación de este serotipo en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, en la cuales se ha detectado su alta frecuencia (16).

### **Transmisión, Colonización y estabilidad de *Streptococcus mutans* en cavidad oral**

La caries dental es una enfermedad dental transmisible en la cual los estreptococos del grupo mutans juegan un papel principal. Como en muchas enfermedades infecciosas, se requiere la colonización de un patógeno antes de que ocurra la infección. Hay un rango de factores de virulencia importante para el establecimiento de *S. mutans* en la compleja comunidad microbiana de la biopelícula dental. Estudiar los factores de virulencia de *S. mutans* y su correlación con la biodiversidad de especies es fundamental para entender el papel que juega en la colonización por los diferentes genotipos en el mismo individuo y la expresión de las características que puedan o no influenciar su capacidad de virulencia y su habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales.

El papel de los estreptococos del grupo mutans, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en la etiología de la caries dental ha sido extensamente investigado y claramente demostrado (16).

La evidencia indica que una forma importante de transmisión de *S. mutans* durante los primeros años de vida es la que se produce de madre a hijo por contacto directo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos el

padre, los hermanos y demás posibles cuidadores constituye otra vía de transmisión (transmisión horizontal) que cobra importancia durante edades posteriores. Una característica importante de *S. mutans* es la persistencia de sus genotipos en la cavidad oral de adultos, adolescentes y niños mayores de cinco años (16).

Este fenómeno es conocido como persistencia “intraindividual” y revela la relativa estabilidad que estos alcanzan en un hospedador y la relación con la expresión de características fenotípicas que les pueden dar ventajas para la supervivencia, como la capacidad de formar biopelículas, de adherirse y soportar fluctuaciones del pH. Se ha considerado comúnmente que la colonización de la cavidad oral de los niños por *S. mutans* (“ventana” de infección) ocurre al producirse la erupción del primer diente, es decir, alrededor de los seis meses de edad. Sin embargo, es lógico pensar que en niños expuestos a factores que facilitan los procesos de transmisión, la colonización se produzca antes de la aparición de los primeros dientes. Hay dos factores que sugieren que *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa pre dental: 1) *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son capaces de colonizar superficies mucosas. 2) Algunos niños desarrollan lesiones de caries poco después de la erupción dental. La colonización temprana de la cavidad oral (antes de la erupción dental) por *S. mutans* puede aumentar el riesgo de caries y hacer que su desarrollo se produzca a edades más tempranas (16).

Se han identificado unos 52 genotipos diferentes en niños pero las madres transmiten cerca de 16 de ellos. Se observa una tendencia hacia la estabilidad de los genotipos transmitidos por las madres, en parte, porque la colonización del genotipo materno pueda interferir con la colonización de otros genotipos. Se ha observado que los niños albergan de uno a cinco genotipos diferentes de *S. mutans* en diferentes edades. La diversidad genotípica de *S. mutans* en cuatro sitios de muestreo (saliva, dorso de la lengua, mucosa alveolar y biopelícula dental) de niños parece ser homogénea, sin embargo, la biopelícula dental es un lugar muy importante dado el gran número de genotipos de *S. mutans* y las cepas aisladas. Se ha demostrado un alto grado de homología entre cepas de *S. mutans* recuperadas de miembros de la misma familia indicando tanto la transmisión vertical y horizontal y una persistente colonización de *S. mutans* adquiridos previamente hasta la adultez temprana. La colonización inicial por *S. mutans* fue investigada en un estudio prospectivo de 46 niños estadounidenses

desde el nacimiento a 5 años de la edad cuyas madres portaban altos niveles de *S. mutans*. De aquel estudio, la ventana de infectividad fue definida como el período a partir de 19 a 31 meses de edad, cuando el riesgo de adquisición de *S. mutans* era alto (16).

### **El biofilm oral: un campo de batalla de interacciones microbianas.**

Las comunidades de biofilm microbiano se encuentran en las superficies de la mucosa, incluido el intestino y en las cavidades vaginal, oral y nasal. Es ampliamente reconocido que las diferentes interacciones, sinérgicas o antagónicas, entre los miembros de estas comunidades complejas pueden desplazar la población bacteriana de la salud a la enfermedad. Esto es particularmente cierto para la cavidad oral, donde *S. mutans*, entre otras bacterias productoras de ácido láctico menos bien caracterizadas, tales como lactobacilos y bifidobacterias, tiende a dominar la flora oral a medida que progresa la caries. La hipótesis de la placa ecológica, la caries dental es una enfermedad que resulta de un cambio en las proporciones de la flora residente como consecuencia de cambios en el medio ambiente (por ejemplo, altas concentraciones de azúcar / bajo pH) (23).

### **Adherencia de *Streptococcus mutans* y desarrollo inicial de la caries**

Las cepas de *S. mutans* son fenotípicamente homogéneas. Sin embargo, recientes investigaciones han revelado un gran nivel de la heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *S. mutans*. La heterogeneidad también se observa a nivel de enzimas producidas por las diferentes especies de *S. mutans* tales como las deshidrogenasas, glucosiltransferasas, aldolasas e invertasas. La serotipificación es un procedimiento rutinario y de mucho valor para determinar otros grupos inmunológicos y tipos de estreptococos (16).

Se ha aceptado que las glucosiltransferasas (Gtfs) de *S. mutans* desempeñan papeles críticos en el desarrollo de la placa dental virulenta. Las Gtfs se adsorben para producir glucanos in situ sobre el esmalte, proporcionando los sitios para la colonización ávida por microorganismos y una matriz insoluble para la formación de la placa (16).

Las Gtfs también se adsorben a las superficies de otros microorganismos orales convirtiéndolos en productores de glucanos. *S. mutans* expresa 3 Gtfs genéticamente

distintas; cada una parece desempeñar un papel diferente pero que se superpone en su papel en la formación de la placa virulenta. GtfC se adsorbe dentro de la película mientras que la GtfB se liga ávidamente a las bacterias promoviendo una apretada fusión celular incrementando la cohesión de la placa (16).

La GtfD forma un polisacárido soluble, fácilmente metabolizable y sirve de iniciador de la GtfB. El comportamiento de Gtfs solubles no refleja lo observado con enzimas adsorbidas en la superficie.

Además, la estructura de la matriz de polisacárido cambia con el tiempo a consecuencia de la acción de mutanasas y dextranasas dentro de la placa.

Las Gtfs en diferentes lugares ofrecen blancos quimioterapéuticos para prevenir la caries dental (16).

Sin embargo, los agentes que inhiben las Gtfs en solución, con frecuencia tienen efecto reducido o ninguno sobre las enzimas adsorbidas. Se han identificado otros productos bacterianos solubles usando técnicas inmunológicas, entre otros, fructosiltransferasa, Glucosiltransferasa (Gtf) y ácido lipoteicoico en la película formada *in vitro* e *in vivo* a partir de saliva entera. Se ha observado que las enzimas cuando se insolubilizan permanecen muy activas en una amplia gama de valores de pH. Está claro que la presencia de Gtf activa dentro de la película dental facilita la formación de glucanos *in situ*, proporcionando así, distintos sitios de unión para los microorganismos orales (16).

### **Coagregación**

*Streptococcus mutans* es capaz de adherirse a las superficies, establecer vínculos con otros estreptococos y con bacterias de otras especies. Muchas cepas de *S. mutans* se aglutinan (adhesión homóloga) mediante la adición de dextranos de alto peso molecular. También se ha informado que ciertas cepas de *S. mutans* forman agregados con *Nocardia*, *Neisseria* al igual que con *Candida albicans* (adherencia heteróloga).

Estos procesos son complejos e involucran una variedad de componentes bacterianos y de factores externos como la dieta, especialmente el consumo de sacarosa que también puede afectar en la proporción de diferentes especies bacterianas que componen la película, que es fermentada por *S. mutans* y *C. albicans*, y que la cual para ambos produce un entorno acidogénico favorable(16).

### ***S. mutans* como organismo modelo de biofilm**

En la actualidad *S. mutans* es una bacteria que es responsable de la formación de biopelículas, en la cavidad bucal, existe una microbiota muy diversa que interactúa constantemente con una película que contiene proteínas salivales y exoproteínas bacterianas, que se encuentra en la superficie del diente, conocida como la película. Grupos específicos de organismos principalmente estreptococos y *Actinomyces spp.*, pueden adherirse a la película en números bajos, y luego estos microorganismos se adhieren conjuntamente con otras especies microbianas orales, es así que *S. mutans* expresa proteínas asociadas a superficies de tipo adhesina, como ejemplo, la familia AgI /II, que tienen la capacidad de unirse a los receptores en la película. Además, se ha demostrado que la adhesina P1 (AgI/II) es una proteína formadora de amiloide que contribuye a la formación de la biopelícula por *S. mutans*, inclusive interactúan con proteínas salivales específicas, como la proteína salival 1 común (CSP-1), que, a su vez, ayuda a la bacteria a unir las superficies recubiertas de saliva. Además, *S. mutans* puede estar presente en esta comunidad colonizando inicialmente en la biopelícula dental. Sin embargo, cuando los azúcares dietéticos, principalmente la sacarosa, están disponibles, *S. mutans* puede convertirse en el microorganismo numéricamente dominante, generando así la formación de biofilms cariogénicos (23).

### ***S. mutans* es el paradigma bacteriano de las respuestas al estrés de las bacterias del ácido láctico (LAB)**

En comparación con otras especies de LAB, *S. mutans* es el organismo mejor estudiado en términos de la genética y la fisiología de las respuestas al estrés. Esto no es del todo sorprendente, dado que la caries dental está directamente relacionada con la capacidad de ciertas bacterias orales, como *S. mutans*, para prosperar en condiciones de gran estrés. Los estudios sobre las respuestas al estrés de *S. mutans* han servido para revelar diferencias críticas en la forma en que las bacterias asociadas al huésped hacen frente a las tensiones ambientales en comparación con las bacterias que tienen un estilo de vida libre y asociado al huésped. En muchos casos, se demostró que el regulón de estrés controla un conjunto más amplio de funciones biológicas, incluido el metabolismo energético, la formación de biopelículas y la competencia genética. En las siguientes dos secciones describiremos los mecanismos clave de la tolerancia al



estrés utilizados por *S. mutans* y destacaremos los estudios con implicaciones más amplias para las respuestas de estrés bacteriano que han servido para cuestionar los dogmas establecidos hace mucho tiempo (23).

### **Contribuciones clave vinculadas a estudios sobre respuestas de estrés ácido por *S. mutans***

La capacidad de *S. mutans* para causar enfermedad depende de su capacidad para unirse irreversiblemente a los dientes mediante la formación de polímeros de glucano extracelular, y para sobrevivir en el ambiente ácido creado por su propio metabolismo de los azúcares presentes en la dieta humana. Cabe destacar que estudios elegantes del grupo Burne sobre metabolismo del carbono y represión del catabolismo del carbono revelaron un control altamente complejo, jerárquico y eficiente de la generación de energía por *S. mutans*, y también indicaron que el metabolismo del carbono se entrelaza con la expresión de rasgos relacionados con la virulencia. La presión de la vida a valores bajos de pH ha llevado a la evolución de vías de respuesta de estrés interconectadas que permiten su persistencia en la cavidad oral. La respuesta al estrés ácido no solo facilita la supervivencia de *S. mutans*, sino que también permite que el organismo supere las especies menos acidúricas de las bacterias orales. Los resultados de experimentos realizados con cultivos de especies bacterianas orales mixtas han demostrado que *S. mutans* domina estas comunidades microbianas durante el crecimiento a pH bajo, mientras que especies menos acidúricas, como *S. sanguinis*, predominan durante el crecimiento a valores de pH neutros (23).

### **Modelo Teórico de *Moringa oleifera***

#### **Descripción botánica, distribución y producción**

Moringaceae es una familia de un solo género de arbustos y árboles, que comprenden 13 especies, distribuidas en el subcontinente indio (*M. oleifera* y *M. concanensis*), Kenia (*M. lonungba* y *M. rivae*), noreste y sudoeste de África (*M. stenopetala*), Arabia y Madagascar (*M. drouhardii* y *M. hildebrandtii*). *Moringa oleifera* Lam. es un árbol tropical dicotiledóneo perenne caducifolio. El tallo es quebradizo con una corteza corcho gris blanquecina, con ramas caídas, verde pálido y bipinnadas o más comúnmente hojas tripinadas (30-60 cm de largo) con folíolos ovalados opuestos. *M. oleifera*, nativo de las montañas subhimalayas del norte de la India; ahora se cultiva

para una variedad de propósitos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se revisaron el potencial de *M. oleifera* (MO), enfatizando sus aplicaciones nutricionales para humanos y usos industriales, y también describieron sus métodos de propagación. Se propaga a través de esquejes (0.2-1.0 m de largo), con un espaciamiento de árbol a árbol recomendado de 1.2 y 5 m entre hileras (para rendimiento de vaina), para obtener la población deseable de 1666 árboles / ha. Para la producción de follaje, los esquejes se plantan con un espaciado cercano para obtener aprox.1 millón de árboles/ha. No se recomienda la propagación a través de semillas debido a la variación genética sustancial a través de la polinización cruzada. El árbol de Moringa crece mejor en el rango de temperatura de 25-35 ° C, bajo la luz solar directa, a una altitud de 500 m, y en suelos ligeramente ácidos a alcalinos (pH 5.0-9.0); aunque puede tolerar un exceso de temperatura, hasta 48 ° C, escarcha en invierno, altitud y una gran variedad de condiciones del suelo. Las semillas de MO se pueden sembrar justo después de la madurez, ya que las semillas no experimentan latencia y conservan la viabilidad hasta 1 año. El árbol comienza a producir frutos a una edad de entre seis y ocho meses, con un mínimo de frutos en el período inicial de uno a dos años, sin embargo, el rendimiento aumenta en los años siguientes. La productividad del genotipo brasileño se estimó en 45 toneladas de mazorcas por hectárea. El rendimiento de aceite de 258 kg / ha se registró en el cultivar indio (PKM-1), cultivado en la región subtropical del noroeste de Argentina, después de 3 años de la plantación. India es el mayor productor de frutas MO (vainas) con una producción anual de 1.1-1.3 millones de toneladas en un área de 38,000 ha (24).

### **Composición fitoquímica**

Diferentes partes del árbol MO se han establecido como buenas fuentes de glucosinolatos únicos, flavonoides y ácidos fenólicos, carotenoides, tocoferoles, como los cultivares más nutritivos, en comparación con los otros cultivares principales de MO de Pakistán contienen Ácido 5-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico (5-HCO-H4folato; 502,1 g/100 g DW), ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico (H4folato; 223,9 g / 100 g de DW), ácido 5-metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico (5-CH3-H4-folato; 144,9 g / 100 g DW), y 10-Formylfolic ácido (10-HCO-ácido fólico, 29.0 lg / 100 g DW) son las principales formas de folatos que se encuentran en el follaje de MO. Además, estas formas son altamente biodisponibles en animales, en comparación con otros alimentos folaterich,

como las verduras de hoja verde (24).

La biodisponibilidad relativa, calculada como la respuesta de los folatos de Moringa en comparación con la respuesta del ácido fólico sintético en un modelo de rata, se registró en un 81,9%. En los cálculos de las dietas recomendadas (RDA), se supone que solo el 50% del folato natural es biodisponible. Por lo tanto, se sugiere que los alimentos basados en MO se pueden utilizar como una fuente importante de ácido fólico, debido a una biodisponibilidad significativamente mayor (24).

en animales. El folato es una de las vitaminas hidrosolubles más importantes, desempeña un papel esencial en diversos metabolismos celulares, incluida la oxidación y la reducción de unidades de un solo carbono. La deficiencia de folato causa enfermedades crónicas graves y trastornos del desarrollo, incluidos los defectos del tubo neural (DTN) durante el embarazo. Por lo tanto, se recomienda encarecidamente una dieta con suficiente contenido de folato durante el embarazo para prevenir los defectos del tubo neural y otras disfunciones crónicas.

El follaje, las flores y las vainas (frutos) inmaduras de varios cultivares de MO de origen indio comercializados se han caracterizado por el contenido de carotenoides. All-E-luteína es el principal carotenoide en el follaje y las vainas inmaduras (frutos), que representan el 53,6 y el 52,0% del total de carotenoides, respectivamente. También se han encontrado otros carotenoides, como la E1-luteoxantina, la 13-Z-luteína, la E-zeaxantina y el 15-Z-b-caroteno en cantidades menores (24).

Entre los diversos tejidos, el mayor contenido de carotenoides totales se registra en las hojas (44.30-80.48 mg / 100 g FW), seguido de las vainas inmaduras (29.66 mg / 100 g FW) y las flores (5.44 mg / 100 g FW). Entre los diversos cultivares indios, se registró el contenido más alto de todo-E-zeaxantina, todo-E-b-caroteno y carotenoides totales en el cultivar Bhagya (KDM-1) (Saini et al., 2012, 2014c). Las hojas MO son una rica fuente de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), que representan 17,3 mg / 100 g de peso muerto en el cultivar PKM-1.

Con evidencia de varios estudios, el follaje de MO se establece como una rica fuente de carotenoides y tocoferoles.

Sin embargo, estas vitaminas se degradan significativamente durante la deshidratación y los otros procesos que ocurren en el follaje de Moringa. Por lo tanto, también se han llevado a cabo experimentos para mejorar aún más el contenido de estas vitaminas en el follaje de MO y, curiosamente, la administración foliar de elicitores bióticos

(carboxi-metilquitosano y quitosano) y moléculas de señalización (metil jasmonato y ácido salicílico) se ha encontrado que es potencialmente beneficioso para la mejora de los principales carotenoides y  $\alpha$ -tocoferol en el follaje de los árboles MO de campo. Se ha encontrado que la elicitación con ácido salicílico (AS) 0.1 mM acumula 49.7 mg / 100 g FW de  $\alpha$ -tocoferol, lo que representa un aumento de 187.5%, en comparación con el control no tratado. Por lo tanto, existe una excelente perspectiva para la mejora de estas vitaminas en el follaje que puede ser útil para mejorar los beneficios nutracéuticos de este árbol (24).

Las hojas MO también se establecen como una rica fuente de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 ( $\alpha$ -3) y omega-6 ( $\alpha$ -6), en forma de ácido  $\alpha$ -linolénico (C18: 3,  $\alpha$ -3, 49-59%) y ácido linoleico (C18: 2,  $\alpha$ -6, 6-13%). El ácido palmítico (C16: 0) se registra en el principal ácido graso saturado, que representa el 16-18% de los ácidos grasos totales en las hojas de Moringa. Las vainas y flores inmaduras se caracterizan por un mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados totales (MUFA, 16-30%) y son bajas en PUFA (34-47%), en comparación con las hojas. Por el contrario, las semillas y el aceite de semilla tienen un alto contenido de ácido oleico (18: 1, 70-80%), palmitoleico (16: 1, 6-10%), esteárico (18: 0, 4-10%) y ácido araquídico (20: 0, 2-4%), y un contenido menor de ácido oleico, linoleico y linolénico. Este aceite de semilla contiene un perfil de ácido graso idéntico, como el aceite de oliva, excepto el ácido linoleico. Para obtener el mayor rendimiento de aceite de las semillas, se considera que la extracción asistida por disolvente usando cloroformo y metanol en la relación de 3:1 a 100 °C es la más favorable. Sin embargo, el aceite extraído con estos solventes no se recomienda para el consumo humano debido a la cantidad residual de estas sustancias tóxicas. Por lo tanto, el hexano se usa de forma rutinaria en la extracción de aceite de las semillas de Moringa, debido a su eficacia y facilidad de recuperación. El análisis del análisis termogravimétrico (TGA) reveló que el aceite se degrada a una temperatura de aproximadamente 425 - 450 °C. En términos de efectos sobre la salud, las hojas de *M. oleifera*, las vainas inmaduras, las flores, las semillas y el aceite de semillas tienen un contenido bajo de ácidos grasos saturados y un alto contenido de MUFA y PUFA que pueden mejorar los beneficios para la salud de los alimentos basados en Moringa. Los detalles de los ácidos grasos de las semillas se dan en la sección de ésteres metílicos (biodiésel) (24).

El potasio (K), el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) son los minerales predominantes en los tejidos MO. El mayor contenido de K se encuentra en las partes vegetativas y en las vainas inmaduras, mientras que las hojas y las semillas son una fuente rica de Ca y Mg, respectivamente (Amaglo et al., 2010). MO también se registra como una fuente rica en hierro (Fe) (17,5 mg / 100 g DW) (24).

En un estudio de biodisponibilidad realizado en un modelo de rata, se encontró que el Fe de la hoja de Moringa era superior en comparación con el citrato férrico para superar la deficiencia de hierro. También se registran cambios significativos en la expresión (hasta 100 veces) de hepcidina hepática (HAMP) y otros genes que responden a la función hepática en respuesta a la deficiencia de Fe, lo que sugiere que la expresión relativa del ARNm de hepcidina hepática (HAMP) puede usarse como marcador molecular más sensible para detectar la deficiencia de hierro en animales. Los resultados de los estudios de biodisponibilidad de animales sugieren que el follaje de Moringa se puede utilizar como una fuente importante de hierro, debido a su biodisponibilidad significativamente mayor (24).

Los granos MO desgrasados se registran como ricos en contenido de proteína y representan 36.18 y 62.76%, respectivamente. Se encontró que las concentraciones de los otros constituyentes cercanos eran más altas en la harina desgrasada, en comparación con la harina entera en grasa. El desengrase también incrementó la absorción de agua, la absorción de grasa, la capacidad de formación de espuma y la estabilidad de la harina en la espuma. El autor sugirió que la harina MO kernel podría usarse como una valiosa fuente de proteínas en la formulación de productos alimenticios. En los estudios aproximados de Brasil, se registró que el polvo de hojas deshidratadas contiene 44.4% de carbohidratos, 28.7% de proteínas crudas, 10.9% de cenizas, 7.1% de grasas, 103.1 mg / 100 g de hierro y 3.0 mg / 100 g de calcio. De forma similar, el perfil proteico mostró 70.1% de proteínas insolubles, 3.5% de glutelina, 3.1% de albúmina, 2.2% de prolamina y 0.3% de globulinas. También se documentaron compuestos antinutricionales, como taninos (20,7 mg / g), inhibidores de tripsina (1,45 TIU mg / g, unidades inhibitorias de tripsina), nitratos (17 mg / g) y ácidos oxálicos (10,5 mg/g) (24).

Otros resultados, revisaron recientemente las posibilidades de fortificación de alimentos con MO, hojas, semillas y polvos de flores para mejorar el valor nutricional. Los autores describen las posibilidades de enriquecimiento en varios alimentos básicos

como Amala (masa dura), ogi (gachas de maíz), pan, galletas, yogur y queso para hacer sopas. Los autores describieron que, aunque muchos de los estudios revisados informaron una mejora en el valor nutricional de los alimentos básicos enriquecidos con MO, ninguno de los informes mostró la digestibilidad in vivo o in vitro y la disponibilidad de nutrientes.

Por lo tanto, se debe determinar la biodisponibilidad de nutrientes y el contenido fitoquímico de los alimentos enriquecidos con MO (24).

### **Actividad biológica y potencial terapéutica de *M. oleifera***

Las diferentes partes del árbol MO, que incluyen raíces, cortezas, hojas, flores, frutas y semillas, se usan tradicionalmente en diversas aplicaciones terapéuticas, que incluyen tumores abdominales, histeria (un trastorno psicológico), escorbuto, parálisis, vejiga helmíntica, problemas de próstata, llagas y otras infecciones de la piel. El potencial terapéutico y las propiedades medicinales de MO se revisan exhaustivamente. Además describieron las actividades fisiológicas y farmacológicas de las hojas, las semillas, la corteza, las raíces, la savia y las flores de *M. oleifera*. Los diversos estudios de seguridad realizados en animales también son revisados por los autores y han llegado a la conclusión de que el follaje de Moringa, las flores y los extractos de frutas ofrecen un alto grado de seguridad sin efectos adversos en los seres humanos (24).

Los fitoquímicos de MO han mostrado propiedades antidislipídicas, antihelmínticas, antihiper glucémicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antiproliferativas, antiulcerosas, antiurolíticas y hepatoprotectoras. Se han demostrado las propiedades antiproliferativas y apoptóticas potentes del extracto de hoja de MO, rico en compuestos fenólicos de quercetina y kaempferol, utilizando el modelo de línea celular de tumor humano (KB). El extracto de hoja MO ha mostrado cambios morfológicos significativos y una menor viabilidad celular, con una mayor fragmentación del ADN internucleosómico y la generación de ROS en las células KB (24).

#### **1.4 Formulación del Problema.**

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* entre el extracto acuoso e hidroetanólico de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668?

#### **1.5 Justificación e importancia del estudio:**

Dado que la caries es una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial y en el Perú es viable estudiar mecanismos para su control. Este estudio investigó el control del factor microbiano; específicamente sobre cepas de *Streptococcus mutans* estándar ATCC 35668.

En relación a los extractos vegetales, estudios han permitido la identificación de principios bioactivos con capacidad inhibitoria sobre diferentes microorganismos, aun así no siempre los resultados de las investigaciones son coincidentes, lo que sugiere que existe una relación entre el efecto del extracto y las especies de vegetales. En nuestro medio, existen reportes de trabajos que revelen el efecto inhibitorio de la “Moringa” procedente de la región Lambayeque sobre *Streptococcus mutans*.

Esta situación motiva la ejecución del presente estudio cuyos resultados permitirán determinar si el extracto acuoso o hidroetanólico de *Moringa oleifera*, tiene efecto antibacteriano, teniendo con ello la posibilidad de incentivar otros estudios destinados a, demostrar el efecto inhibitorio sobre otros microorganismos tipo parásitos u hongos, la purificación del extracto, a su uso en terapia o como desinfectante.

#### **1.6 Hipótesis.**

El extracto acuoso tiene mayor efecto antibacteriano *in vitro* que el extracto hidroetanólico de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668

#### **1.7 Objetivos**

##### **1.7.1 Objetivo General**

- Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso e hidroetanólico de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668

### 1.7.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668
- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Tipo y Diseño de Investigación.

Para el presente proyecto de investigación se empleó el tipo de investigación cuantitativa, con diseño experimental de estímulo creciente (20).

### 2.2 Población y muestra.

La población estará conformada por la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Para determinar el tamaño de muestra se hará uso de la siguiente fórmula para calcular el número de repeticiones:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2 S^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

**Donde:**

$Z_{\alpha/2} = 1.96$  para un  $\alpha = 0,05$

$Z_{\beta} = 0.84$  para un  $\beta = 0.20$

$S = 0.7$  ( $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ ) valor asumido por no estar definido los parámetros a investigar

$(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) = 1$

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 2 (0.7)^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} = 2.8^2 \times 2 (0.7)^2$$

= 8 repeticiones

Luego la muestra estará conformada por 8 repeticiones para cada concentración de hojas de *Moringa oleífera*.

### **2.3 Variables, Operacionalización**

**Variable Independiente:** Extracto de hojas de *Moringa oleifera* “Moringa”

**Variable Dependiente:** Efecto antibacteriano

<b>Variables</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Valor final</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala</b>
<b>Variable Independiente:</b> Extracto de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.	La presencia de principios bioactivos obtenidos a través de diferentes solventes	Acuoso	Concentraciones	76 mg/mL	Cualitativa	Ordinal
			Hidroetanólico	Concentraciones	38 mg/mL 19 mg/mL		
<b>Variable Dependiente:</b> Efecto antibacteriano	Capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias	El crecimiento bacteriano depende del tipo agente químico presente en los extractos	Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35668	Halo de inhibición de crecimiento microbiano	mm	Cuantitativa	Razón

## **2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.**

### **Método de difusión en pozo**

Método de difusión en pozo en agar es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Con una variante al método Kirby-Bauer, para este método se emplea un sacabocado para realizar pozos en el agar con un diámetro de 6 mm (26).

## **2.5 Procedimiento para la recolección de datos**

### **Identificación del espécimen**

Se llevaron dos ejemplares (Ramas, hojas verdes y flores) prensados en cartulinas de 27 x 42 cm, al herbario del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Pedro Ruiz Gallo para su identificación y certificación (Anexo 1)

### **Colección de la muestra.**

Para el procedimiento, se siguió las orientaciones de Gonzalez (27).

### **De la desinfección**

- Las hojas verdes de *Moringa oleifera* “Moringa” se desinfectaron con una torunda de algodón humedecido con alcohol de 95 grados.

### **Del secado**

- Las hojas de *Moringa oleifera* “Moringa” fueron secadas empleando una estufa a una temperatura de 50 °C.

### **De la molienda y tamizaje.**

- Las hojas de *Moringa oleifera* “Moringa” para la molienda y tamizaje se llevó licuar 1Kg de hojas secas hasta obtener material en polvo.

### **Preparación del extracto acuoso de *Moringa oleifera* “moringa” (Anexo 2)**

- Se pesó 40 g de polvo *Moringa oleifera* “moringa” y se agregó 500 mL de agua destilada y se hirvió por 15 minutos.
- El producto fue filtrado con papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto purificado libre residuos.
- El extracto resultante fue distribuido en placas petri y fue secado empleando una hornilla a una temperatura de 50°C hasta sequedad.

- El residuo seco obtenido, posteriormente fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su reactivación en agua destilada estéril para su posterior uso

### **Preparación del extracto hidroetanólico de *Moringa oleifera* “Moringa”**

#### **(Anexo 3)**

- Se maceraron 40 g de polvo *Moringa oleifera* “Moringa” y se agregaron 200 mL de etanol al 70 % (Hidroetanol) en una botella de vidrio ámbar hermética.
- Se agitó la botella diariamente durante una semana.
- El producto fue filtrado con papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto purificado libre residuos.
- El extracto resultante fue distribuido en placas petri y fue secado empleando una hornilla a una temperatura de 50°C hasta sequedad.
- El residuo seco obtenido posteriormente fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su reactivación en agua destilada estéril para su posterior uso.

### **Preparación del agente antibacteriano**

Siguiendo las recomendaciones del CLSI (28), para evaluar la potencia puede expresarse como porcentaje o en unidades de µg/mg, mg/mL, (p/p).

- El residuo seco se resuspendió en 30 mL de agua destilada estéril, considerado como la solución Stock (madre).
- Mediante el método de dilución doble seriada, se calcularon 3 diluciones (Anexo 4).
- Luego fueron distribuidas en los pocillos del agar en la placa petri.

### **Actividad Antibacteriana**

#### **Preparación del inóculo**

Según las orientaciones de la Clinical and Laboratory Standards Institute (28).

#### **Colonias para el inóculo**

Las colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 fueron seleccionadas de un cultivo en placa de agar cerebro corazón, después de 24 horas de su reactivación (Anexo 5) (28).

### **Preparación de la suspensión del inóculo.**

- De la placa de agar, se seleccionó de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se tocó con un asa y se transfirió a un tubo con 4-5 mL de caldo Müller-Hinton.
- Con ayuda del espectrofotómetro con una longitud de onda de 625 nm, se midió turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland, con absorbancias de 0,08 – 0,1 para bacterias (28).
- La suspensión bacteriana resultante contiene aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  (UFC/mL).

### **De la Siembra**

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, una torunda de algodón se sumergió en ella. La torunda debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de agar Cerebro Corazón por rayado con la torunda sobre toda la superficie. Este procedimiento fue repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente  $60^\circ$  cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.
- Las tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que un exceso de humedad.

### **Método de difusión de pozo (26)**

Sobre las placas sembradas:

- Se realizaron 5 perforaciones de 6 mm de diámetro, con un sacabocado.
- Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto en cada pozo, con ayuda de una micropipeta, las concentraciones del extracto (hidroetanólico/acuoso) de *Moringa oleifera* “Moringa”.
- Cada pozo será marcado con su respectiva identificación, se selló con parafilm y se incubará las placas a  $37^\circ\text{C}$ , por un periodo de 18 horas.

### **Lectura e interpretación de resultados**

- Después de 18 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.

- Los tamaños de las zonas de inhibición fueron medidos con un Vernier en milímetros y fueron interpretados según orientaciones del CLSI (Clínical Laboratory Estándar Institute).
- La actividad se consideró en función al diámetro del HICM (30): nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

### **Instrumento de recolección de datos**

Se empleó una ficha de recolección de datos, con la finalidad de determinar la sensibilidad del extracto acuoso e hidroetanólico de hojas de *Moringa oleífera* a diferentes concentraciones, midiendo los halos inhibición de crecimiento bacteriano.

### **2.6 Procedimientos de análisis de datos.**

Para determinar la relación del efecto antibacteriano del extracto en el crecimiento bacteriano, se realizó un análisis de varianza.

Para determinar si el extracto hidroetanólico tiene mayor efecto antibacteriano que el extracto acuoso, se empleó la prueba t student. Y para la comparación de las concentraciones de los extractos se empleó la prueba de Duncan.

### **2.7 Aspectos éticos**

Se considerarán aspectos de bioseguridad, con respecto a su inactivación de los medios con *Streptococcus mutans*, mediante autoclavado, con la finalidad de evitar su propagación, contacto con el personal de que labora en la Universidad.

### **2.8 Criterios de rigor científico**

#### **Validez**

Para el presente estudio se tomará en cuenta la ficha de recolección de datos en relación a número de repetición, con la finalidad de tener una consistencia interna del efecto antibacteriano de los extractos de *M. oleífera*.

#### **Confiabilidad**

Para la medición de los halos inhibición de crecimiento bacteriano, se empleó el calibre o pie de rey VERNIER, con la finalidad de reducir los errores de medida en milímetros (mm).

### III. RESULTADOS

**Tabla 1.**

*Comparación del efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso y extracto hidroetanólico de hojas de Moringa oleifera sobre Streptococcus mutans ATCC 35668*

Comparación	Extracto acuoso		Extracto hidroetanólico		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
76 mg/mL	0	0	17,96	0,48	0,000
38 mg/mL	0	0	15,27	0,434	
19 mg/mL	0	0	0	0	

#### 3.1 Tablas y Figuras:

*Fuente: Datos proporcionados por el investigador*

En la tabla 1 se observa que las concentraciones de extracto hidroetanólico de 76 mg/mL, 38 mg/mL y 19 mg/mL presentan halos de inhibición promedio de 17,96; 15,27 mg/mL; 0 respectivamente. Mientras las tres concentraciones de extracto acuoso no presentan halos de inhibición. Al aplicar la prueba de T de student para comparar el efecto antibacteriano entre cada concentración de extracto acuoso vs hidroetanólico de Moringa oleífera, se obtuvo valores de  $P = 0,000$  ( $P < 0,05$ ).



**Tabla 2.**

Análisis de varianza de un solo factor para el extracto hidroetanólico de *Moringa oleifera*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad (P)	En la tabla 2 se observa que
Entre grupos	1501,94348	2	750,9717375	5391.246369	0,000	
Dentro de los grupos	2,9251875	21	0,139294643			
Total	1504,86866	23				

al aplicar un análisis de varianza para el efecto antibacteriano de las tres concentraciones de *Moringa oleifera*. Se obtuvo un valor de  $P = 0,000$  ( $P < 0,05$ )

**Tabla 3.**

Prueba de Duncan para las concentraciones del extracto hidroetanólico de *Moringa oleifera*.

Concentraciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
19 mg / mL	8	0		
38 mg / mL	8		15,27	
76 mg / mL	8			17,96

En la tabla 3 se observa que al aplicar la prueba de Duncan las tres concentraciones de extracto hidroetanólico presentan diferente efecto antibacteriano.

**Tabla 4.**

*Evaluación del efecto antibacteriano extracto hidroetanólico de las hojas de Moringa oleifera sobre Streptococcus mutans ATCC 35668*

Concentración	Halo (mm )	P
76 mg/mL	17,96	0,000
38 mg/mL	15,27	
19 mg/mL	0	

*Fuente: Datos proporcionados por el investigador*

En la tabla 4 se observa que las concentraciones de extracto hidroetanólico de 76 mg/mL, 38 mg/mL y 19 mg/mL presentan halos de inhibición promedio de 17,96; 15,27 mg/mL; 0 respectivamente.

**Tabla 5.**

*Evaluación del efecto antibacteriano extracto acuoso de hojas de Moringa oleifera sobre Streptococcus mutans ATCC 35668*

	Concentración	Halo (mm )	
<i>Fuente: Datos</i>	76 mg/mL	0	<i>proporcionados</i>
	38 mg/mL	0	
	19 mg/mL	0	

*por el investigador*

En la tabla 5 se observa que las concentraciones extracto acuoso de 76 mg/mL, 38 mg/mL y 19 mg/mL no presentan halos de inhibición.

### 3.2 Discusión de resultados

La caries dental es una enfermedad multifactorial; entre los factores que influyen; el factor microbiano es uno de los más estudiados. El microorganismo *Streptococcus mutans* es el más frecuentemente asociado a caries dental. Por tanto su control podría alterar el rol de biofilm cariogénico durante el proceso carioso (16).

Esta investigación encontró que el extracto hidroetanólico presenta efecto antibacteriano a concentraciones de 76 mg/mL y 38 mg/mL. La cepa *Streptococcus mutans* ATCC 35668 fue muy sensible a las dos concentraciones mencionadas en concordancia a los parámetros de la escala de Duraffourd (26).

El estudio mostró halos promedio de 17,96 y 15,27 mm para las concentraciones de 76 y 38 mg/ml respectivamente. Por otro lado, Rao *et al.*, encontraron halos de 17mm y 21mm en concentraciones de 100 mg/ml y 250 mg/ml de extracto hidrometanólico respectivamente (5). Esta similitud, sugiere que a mayor concentración, mayor será el efecto. También podría concluirse que el metanol y etanol tienen similar capacidad solvente. Otros autores como Elgamily *et al.*, compararon el efecto antibacteriano de extractos de etanol, acetona y acetato de etilico; encontrando que los extractos etanólicos presentaron mayor actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* en concentraciones 193.8 mg/ml, 73.4 mg/ml, 64.0 mg/ml y 123.6 mg/ml (18).

La investigación demostró que el extracto acuoso en concentraciones de 76 mg/mL, 38 mg/mL y 19 mg/mL no tuvo efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*. Sin embargo otros estudios como Khulood Majid Alsaraf *et al.*, encontraron efecto del extracto acuoso al 1000 mg/mL con otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus spp* (19), esto sugiere que la concentración utilizada para el estudio fue demasiado baja; además Amabye y Tadesse demostraron que el extracto etanólico de hojas de *M. oleifera* tuvo mayor efecto antibacteriano que el extracto acuoso contra *S. mutans* obteniéndose zonas de inhibición 6 mm y 2 mm, teniendo como diámetro el pozo de 6 mm (17). Se puede concluir que el agua no tuvo la misma capacidad solvente como el etanol dado que probablemente necesite altas concentraciones de moringa para tener efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.

Complementando con el estudio, otros autores también demostraron el efecto antibacteriano de los extractos de hojas de *M. oleifera*. Es así que Abdulkadir *et al.*, revelaron su capacidad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas *M. oleifera* a concentraciones de 100 mg/mL, 50 mg /mL, 25 mg/mL y 12,5 mg/mL contra diferentes cepas microbiológicas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, evidenciándose diferentes tamaños con respecto a los halos de inhibición (4), inclusive comprobándose su poder antibacteriano contra cepas multidrogorresistentes tal como lo demostraron Othman y Ahmed (21).

Con el presente estudio se puede corroborar que *M. oleifera* puede ser empleado como una alternativa en el control del crecimiento microbiano, considerando que los principios bioactivos presentes en las hojas son solubles a disolución orgánicas.

#### IV. CONCLUSIONES

Se concluye que:

- El extracto hidroetanólico de hojas de *Moringa oleífera* presentó mayor efecto antibacteriano *in vitro*, que el extracto acuoso sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- El extracto acuoso de hojas de *Moringa oleífera* no presentó efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- El extracto hidroetanólico de hojas de *Moringa oleífera* presentó efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en las concentraciones de 76 mg/mL y 38 mg/mL.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere:

- Para estudios posteriores incrementar las concentraciones del extracto acuoso con la finalidad de evidenciar actividad antibacteriana.
- Realizar estudios con células eucariotas con la finalidad de evidenciar su citotoxicidad.
- Emplear el equipo de rotavapor con la finalidad de trabajar a una temperatura estable para la obtención del residuo seco de los extractos.



## REFERENCIAS

1. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Microbiological Approach. J Clin Infect Dis Pract 2017; 2(1) 1 – 15
2. Ministerio de Salud| Salud bucal. MINSA [Internet]. 2005 [citado 8 de octubre 2017]  
Disponible en:  
[https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion\\_2.asp?sub5=13](https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13)
3. Garcia SS, Blackledge MS, Michalek S, Su L, Ptacek T, Eipers P, Morrow C, Lefkowitz EJ, Melander C, Wu H. Targeting of *Streptococcus mutans* Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. Journal of Dental Research. 2017; 1 – 8
4. Abdulkadir IS, Nasir IA, Sofowora A, Yahaya F, Ahmad AA, Hassan IA. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of Ethanolic Extracts of *Moringa oleifera* Lam on Isolates of Some Pathogens. J App Pharm. 2015; 7(4): 1 – 7
5. Rao PK, Rao DB, Kiran CR, Nadh MR, Madhavi Y, Rao TR. *In vitro* antibacterial activity of *Moringa oleifera* against dental plaque bacteria Journal of Pharmacy Research. 2011; 4(3): 695-697
6. Portal Regional de la Biblioteca Virtual de Salud. Información y Conocimiento para la Salud  
Disponible en: <http://decs.bvsalud.org/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>
7. OMS| Salud bucodental [Internet]. 2012 [Citado 22 de octubre del 2017]  
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
8. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. (2012) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990- 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012; 380 (9859): 2163-2196.
9. Farooqi FA, Khabeer A, Moheet IA, Khan SQ, Farooq I, ArRejaie AS. Prevalence of dental caries in primary and permanent teeth and its relation with tooth brushing habits among schoolchildren in Eastern Saudi Arabia. Saudi Med J. 2015; 36(6): 737-742
10. Martins S, Álvarez E, Abanto J, Cabrera A, López RA, Masoli C, Echevarría SA,

- Mongelos MG, Guerra ME, Amado AR. Relatorios de la mesa de representantes de sociedades de Odontopediatría de los países Latinoamericanos. Rev. Odont. Latinam. 2014; 4(2)
- Disponible en: <https://www.revistaodontopediatria.org/ediciones/2014/2/art-4/>
11. Azizi Z. The Prevalence of Dental Caries in Primary Dentition in 4- to 5-Year-Old Preschool Children in Northern Palestine. International Journal of Dentistry. 2014; 1 -5
  12. Scalioni F, Carrada C, Machado F, Devito K, Ribeiro LC, Cesar D, Ribeiro R. Salivary density of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and dental caries in children and adolescents with Down syndrome. J Appl Oral Sci. 2017; 25(3): 250-7
  13. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Riz MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. PLOS Pathogens. 2013; 9(10): 1 – 5.
  14. Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Nomura R, Isozaki T, Nakano K. Presence of *Streptococcus mutans* strains harbouring the *cnm* gene correlates with dental caries status and IgA nephropathy conditions Scientific Reports 2016; 1 - 6
  15. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. Expert Rev Proteomics 2012; 9: 311–323.
  16. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* and dental caries Rev. CES Odont 2013; 26(1) 44-56
  17. Amabye TG, Tadesse FM. Phytochemical and Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Available in the Market of Mekelle. J Anal Pharm Res. 2016, 2(1): 1- 4
  18. Elgamily H, Moussa A, Elboraey A, EL-Sayed H, Al-Moghazy M, Abdalla A. Microbiological Assessment of *Moringa Oleifera* Extracts and Its Incorporation in Novel Dental Remedies against Some Oral Pathogens. Journal of Medical Sciences. 2016; 4(4): 585-590
  19. Khulood A, Suha TA, Nada SH. An Antimicrobial Activity of *Moringa Oleifera* Extract in Comparison to Chlorhexidine Gluconate (*In vitro* study) J Bagh Coll Dentistry 2016; 28(1):183 – 187
  20. Al\_husnan LA, Alkahtani MDF, Impact of Moringa aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi in vitro. Annals of Agricultural Science. 2016; 61: 247–250

21. Othman AS, Ahmed NA. Antibacterial Effect of the Ethanol Leaves Extract of *Moringa oleifera* and *Camellia sinensis* against Multi Drug Resistant Bacteria. *Int. J. Pharmacol.* 2017; 13(2): 156 – 165
22. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2016; 6(53): 1 – 7
23. Lemos JA, Quivey RG, Koo H Jr., Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology.* 2013; 159: 436 – 445
24. Saini RK, Sivanesan I, Keum YS. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *Biotech.* 2016; 6 (2): 203 – 217
25. Hernández R, Fernández C, Baptisita P. Metodología de la Investigación. 6ta Edició. Mexico: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2014. 689 p.
26. Valgas C, Machado S, Smânia EFA, Smânia AJr. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38: 369-380
27. Gonzalez AA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas. (Tesis Licenciatura). Manizales, Universidad Nacional de Colombia; 2004
28. Clinical and Laboratory Standars Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8
29. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2016; 6: 71 – 79
30. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2001; 62(2): 156 – 161
31. Pabón LC, Rodríguez MF, Hernández-Rodríguez P. Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2017; 16(6): 529-546
32. Wassel MO, Khat tab MA. Antibacterial activity againt *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demoralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J. Adv. Res.* 2017; 8(4): 387 – 392

Anexos

Anexo N° 1

Constancia de identificación de *Moringa oleifera*



**HERBARIO**  
**PEDRO RUIZ GALLO**  
UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CONSTANCIA**

La que suscribe, Directora del Herbario "PRG" de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, hace constar que la Bachiller Vanessa Rosmery Chero Chiclayo de la Universidad Señor de Sipán ha hecho llegar al herbario dos ejemplares botánicos los que han sido identificados como la especie **Moringa oleifera "moringa"** y registrados con el N° de herbario 18018 PRG.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que crea conveniente.

Lambayeque, 13 de Junio del 2018.

  
\_\_\_\_\_  
**Msc. Josefa Escurra Puicón**  
**Directora del Herbario PRG**



## Anexo 2

### Preparación del extracto acuoso de *Moringa oleifera*



**1**  
**Pesado del triturado**  
*Moringa oleifera*



**2**  
**Ebullición y filtrado de**  
*Moringa oleifera*



**3**  
**Almacenamiento del**  
**residuo seco de**  
*Moringa oleifera*

**Fig. 1.** Obtención del extracto acuoso de *Moringa oleifera* “Moringa”

### Anexo 3

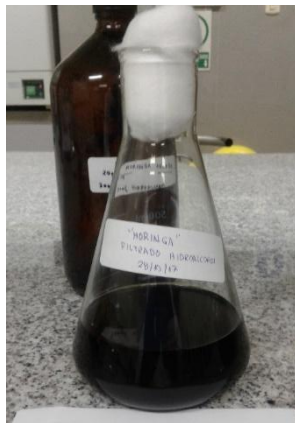
#### Preparación del extracto hidroetanólico de *Moringa oleifera*



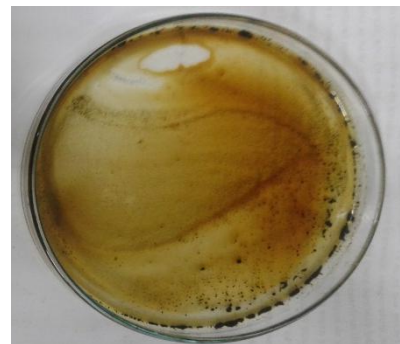
**1**  
**Pesado del triturado**  
*Moringa oleifera*



**2**  
**Macerado en Etanol al 70%**  
*Moringa oleifera*



**3**  
**Filtrado**  
*Moringa oleifera*

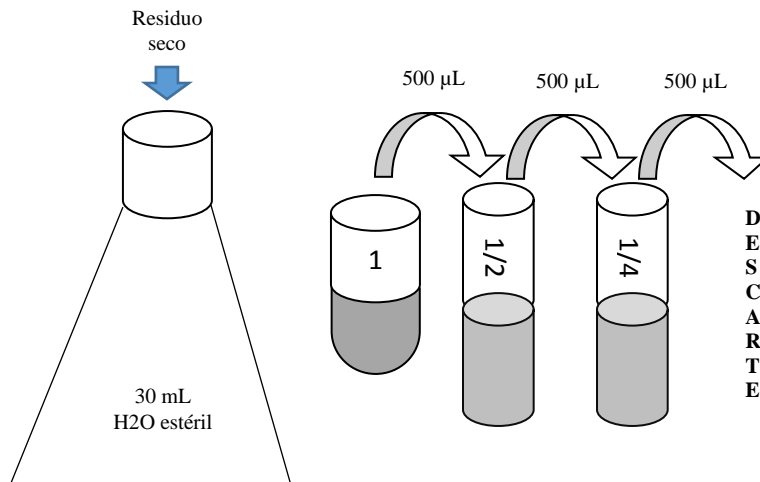


**4**  
**Secado**  
*Moringa oleifera*

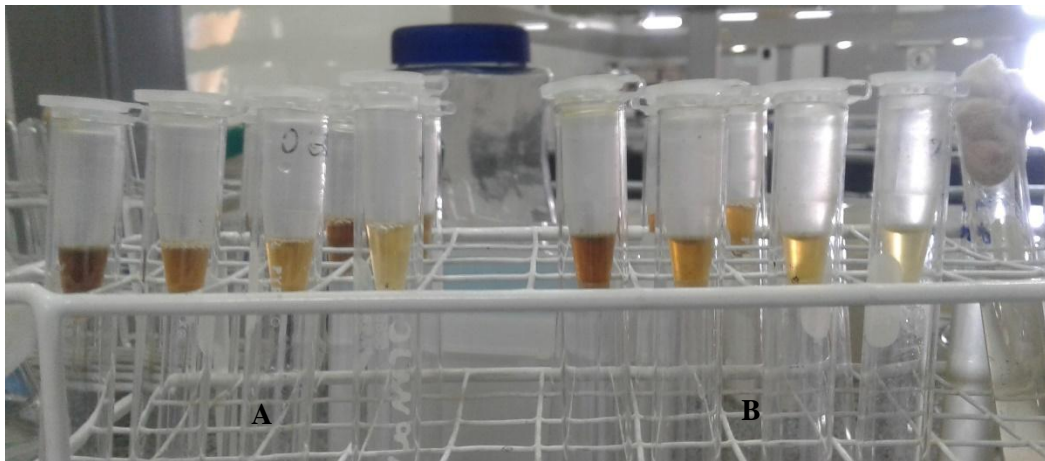
**Fig. 2.** Obtención del extracto hidroetanólico de *Moringa oleifera* “Moringa”

## Anexo 4

### Preparación del agente antibacteriano



**Fig. 3.** Preparación del agente antibacteriano, mediante el método de dilución doble seriada

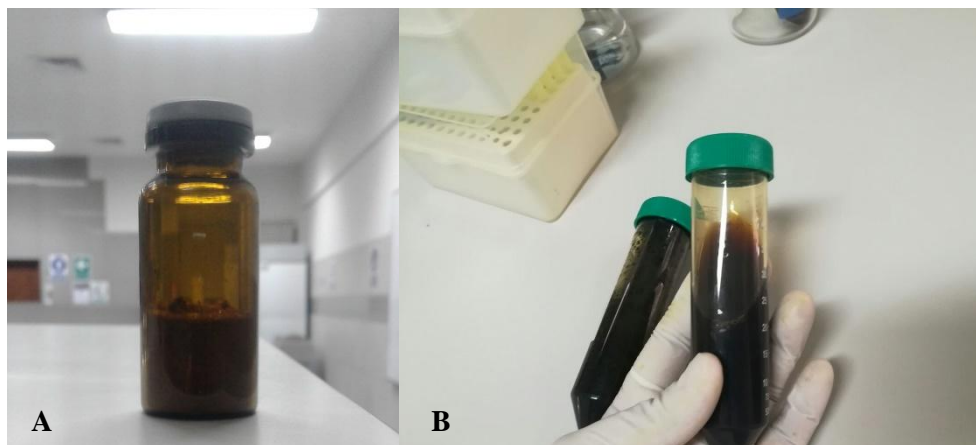


**Fig. 4** Método de dilución doble seriada **A:** Extracto acuoso, **B:** Extracto hidroetanólico

## Anexo 5

### Del extracto acuoso:

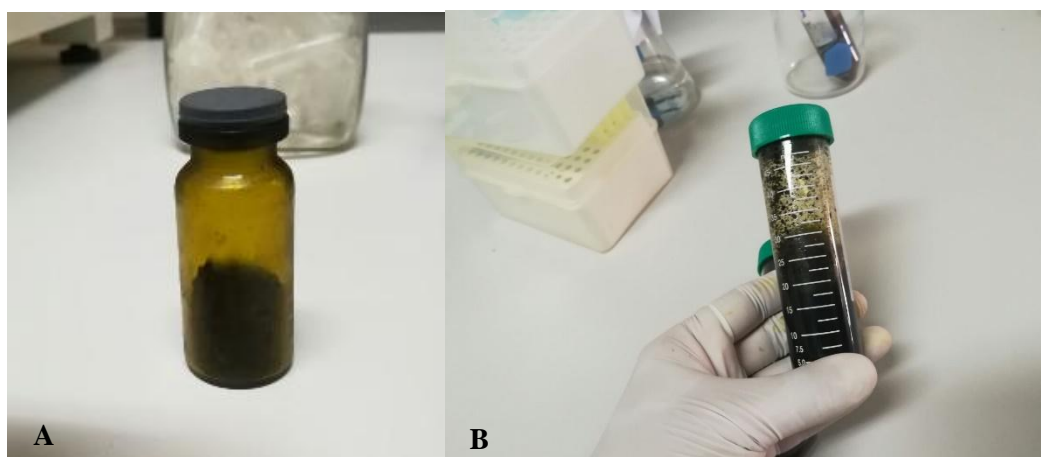
Se obtuvo 1,9 g de residuo seco extracto, que fue reactivado en 25 mL de agua destilada estéril, obteniendo una concentración de 0,076g/mL equivalente a 76 mg/mL (Figura 1A, 1B).



**Figura 5.** (A) Residuo seco del extracto. (B) Reactivación del residuo seco en agua destilada.

### Del extracto hidroetanólico:

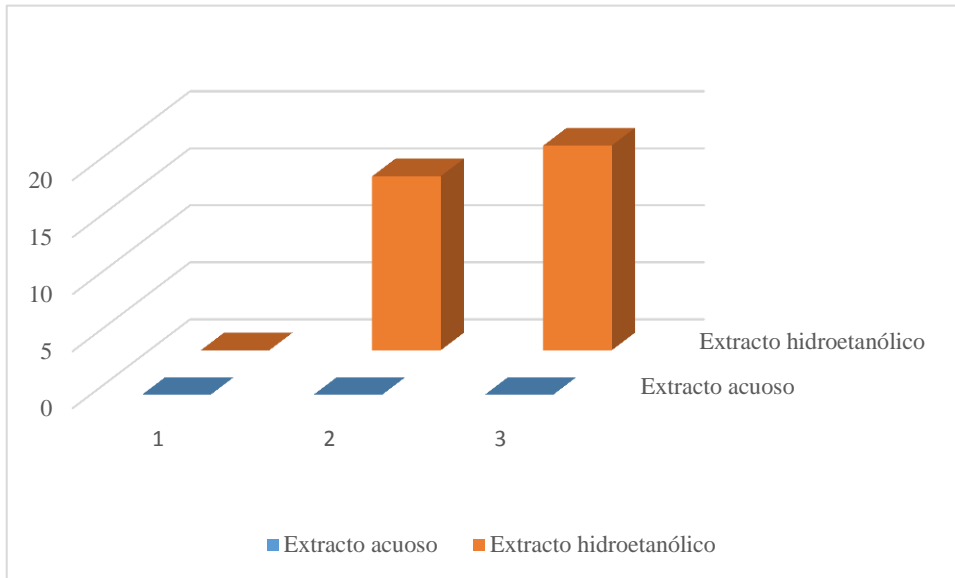
Se obtuvo 2,3 g de residuo seco extracto, que fue reactivado en 30 mL de agua destilada estéril, obteniendo una concentración de 0,076g/mL equivalente a 76 mg/mL (Figura 2A, 2B).



**Figura 6.** (A) Residuo seco del extracto. (B) Reactivación del residuo seco en agua destilada.



## Anexo 6



**Gráfica 1.** Comparación del efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso y extracto hidroetanólico de las hojas de *Moringa oleifera* contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668

## Anexo 7

### Certificación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668



#### Certificate of Quality

**Product Name:** S. mutans ATCC 35668 PK/5  
**Lot Number:** 356358

**Product Number:** R4607002  
**Expiration Date:** 2014-12-31  
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

**Purity:**

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

**Viability And Quantification:**

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

**Macroscopic And Microscopic Morphology:**

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

**Biochemical Analysis:**

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)                      Passage: 3  
Gram Reaction: Gram Positive Cocci                      Biochemical Profile: Vitek GPI

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop  
pH: N/A

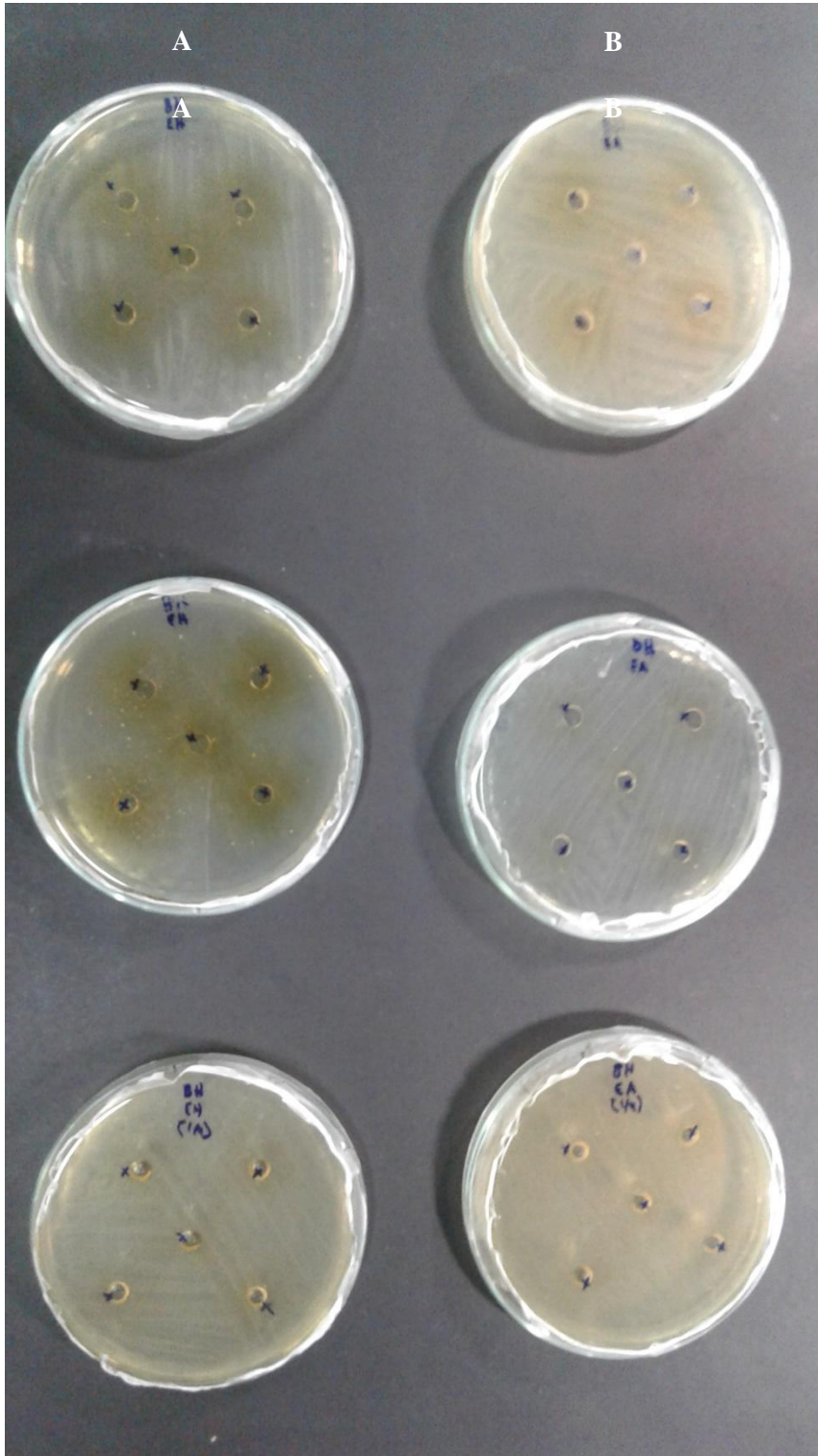
Signed

A handwritten signature in cursive script that reads "Michelle Anne Stone".

Quality Control Supervisor

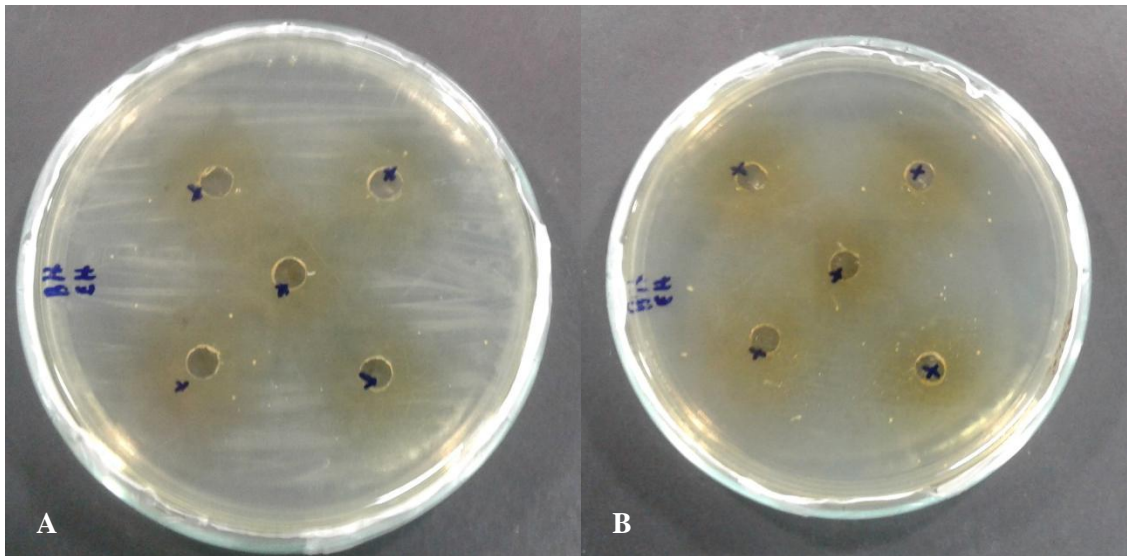
## Anexo 8

### Efecto antibacteriano del extracto de *Moringa oleifera*

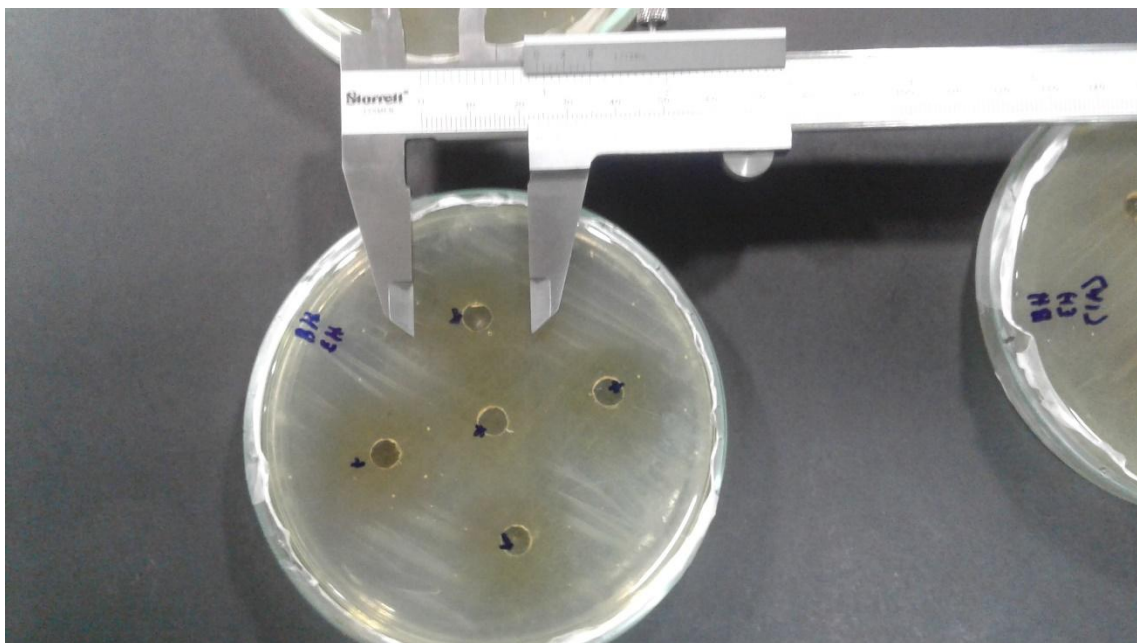


**Figura 7.** (A) Extracto hidroetanólico. (B) Extracto acuoso

## Anexo 9



**Figura 8.** (A) Halo de inhibición del extracto hidroetanólico a la concentración 76 mg/mL (B) Halo de inhibición a la concentración 38 mg/mL.



**Figura 9.** Empleando el Vernier para la medición de los halos inhibición del crecimiento microbiano.