

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Instituto de Ciencias Agropecuarias

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

**EFFECTO DE LA ESTERILIZACIÓN SOBRE COMPUESTOS BIOACTIVOS
DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO XOCONOSTLE ULAPA (*Opuntia
oligacantha*) Y DE LA PLANTA SANGRE DE DRAGO (*Jatropha dioica
sessé ex cerv.*) CON POSIBLE APLICACIÓN ANTIMICROBIANA EN
PRODUCTOS BUCALES**

Para obtener el título de
Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

P R E S E N T A

M. en C. Jorge Alberto Terrazas Hernández
No de cuenta 124733

Directora:
Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

San Agustín Tlaxiaca, Hgo., junio 2019

AGRADECIMIENTOS

Nuestras vidas cobran sentido cuando disfrutamos de los pequeños momentos, de las pequeñas cosas, es así como desconocemos menos con cada experiencia, en mi camino he aprendido a valorar el esfuerzo, trabajo, dedicación y la importancia de los seres que nos aman y apoyan, nuestros logros están acompañados de ellos, las nuevas experiencias nos forman y dan carácter al afrontar todos los obstáculos, es así como alcanzamos nuestras metas, ningún camino es fácil, esta ocasión me tocó vivir de todo en tampoco durante mi formación doctoral, agradezco a mis compañeros de generación, su apoyo y amistad así como a los doctores investigadores por su apoyo y confianza. Hoy concluyo este objetivo, sin embargo, nacen nuevas inquietudes y continuaremos en el camino del conocimiento. El presente trabajo está dedicado a la persona más importante en mi vida, desgraciadamente se me adelantó y no pudimos estar juntos para celebrar un logro más, ella me motivó a continuar y a no quedarme en la ignorancia, dudando de todo e investigando, es la persona que más admiro por su coraje y valentía, la única persona que entendía por lo que pasaba, desde frustraciones, enojos y excesivo estrés, la persona que más me apoyaba en todos los aspectos y la persona por la que hoy culmino el presente trabajo. ¡Esa persona es mi madre, sé que desde donde se encuentre estará orgullosa de mí, al escribir estos párrafos la nostalgia y tristeza me invaden, mira mami lo he logrado gracias a ti!!! ¡Te prometo seguir en este mi camino para ser un excelente profesionista, agradezco el apoyo de mi familia, mis hijos y mi esposa que son mi fuente de combustible para levantarme día a día y nunca rendirme, los que me roban una sonrisa cuando estoy triste, con ellos no hay días malos sólo experiencias nuevas y momentos increíbles, hijos ustedes son todo para mí! Agradezco enormemente a este posgrado y a todos los doctores que nos brindaron su amistad y nos abrieron las puertas para facilitar nuestras investigaciones, también a mi asesora que me ha apoyado en varias ocasiones y ha confiado en mí, , así como al Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y a su alumno de doctorado Raúl (rulo) por habernos brindado sus instalaciones y apoyo en todo momento durante la fase experimental de la investigación.

Se agradece al financiamiento del proyecto de tesis FOMIX-CONACYT-HIDALGO (proyecto número 195462) y al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo con la beca número 318935 otorgada.

ÍNDICE GENERAL

Página

1	RESUMEN
2	ABSTRACT
3	I INTRODUCCIÓN
7	II ANTECEDENTES Y OBJETIVOS
8	2.1 Enfermedades bucales
11	2.2 <i>Streptococcus</i>
13	2.3 Enfermedades gingivales inducidas por placa: factores de riesgo
15	2.4 Etapas de la patogenia de la gingivitis
16	2.5 <i>Porphyromonas gingivalis</i>
17	2.6 Fisiopatología
17	2.7 Aislamiento
18	2.8 Tratamiento de la caries: Dentífricos
20	2.9 Compuestos con propiedades antimicrobianas
22	2.10 Actividad antimicrobiana de compuestos naturales
25	2.11 Planta sangre de drago (<i>Jatropha dioica</i>)
27	2.12 Fruto xoconostle
30	2.13 Métodos de esterilización y su impacto sobre los compuestos bioactivos
34	2.14 Objetivos
34	2.14.1 Objetivo general
34	2.14.2 Objetivos específicos
35	III JUSTIFICACIÓN
37	IV MATERIAL Y MÉTODOS
38	4.1 Material vegetal
38	4.2 Procedimiento de extracción
39	4.3 Esterilización de los extractos
40	4.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas
40	4.5 Determinación del contenido de fenoles totales
41	4.6 Determinación del contenido de flavonoides
41	4.7 Cuantificación de betalaínas
42	4.8 Identificación de compuestos de extracto por HPLC
43	4.9 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH
43	4.10 Determinación de actividad antioxidante por el método ABTS
44	4.11 Actividad antimicrobiana
45	4.12 Análisis estadístico
46	V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

47	5.1 Análisis fisicoquímicos
49	5.2 Determinación de fenólicos totales y los flavonoides
51	5.3 Determinación de betalainas en extractos de xoconostle
52	5.4 Identificación de compuestos por HPLC
54	5.5 Actividad antioxidante por DPPH y ABTS
56	5.6 Actividad antimicrobiana
61	VI CONCLUSIONES
64	VII REFERENCIAS
76	VIII ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- 28 **Figura 1.** Corte longitudinal de xoconostle variedad Ulapa.
- 57 **Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Streptococcus mutans* de extractos: (◆) extracto de los rizomas de la planta sangre de drago (5 mg/mL); (■) Extracto del fruto xoconostle (5 mg/mL); (▲) control negativo (clorhexidina); (●) Control positivo; SA: extracto esterilizado por filtración de los rizomas de la planta sangre de drago; XA: extracto esterilizado por filtración del fruto xoconostle; CN: control negativo; CP: control positivo.
- 58 **Figura 3.** Cinética de crecimiento de *Streptococcus mutans* de extractos: (◆) extracto de los rizomas de la planta sangre de drago (5 mg/mL); (■) Extracto del fruto xoconostle (5 mg/mL); (▲) control negativo (clorhexidina); (●) Control positivo; SB: extracto esterilizado por autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago; XB: extracto esterilizado por autoclave del fruto xoconostle; CN: control negativo; CP: control positivo.
- 59 **Figura. 4** Densidad óptica de *S. mutans* a diferentes concentraciones del extracto de los rizomas de sangre de drago esterilizados por autoclave con un tiempo de inoculación de 96 horas; CN: control negativo (Clorhexidina); CP: control positivo (*S. mutans*).
- 60 **Figura 5.** Densidad óptica de *S. mutans* a diferentes concentraciones del extracto de xoconostle esterilizados por autoclave a las 96 horas de inoculación; CN: control negativo (Clorhexidina); CP: control positivo (*S. mutans*).

ÍNDICE DE TABLAS

Página

- 10 **Tabla 1.** Bacterias encontradas en distintos sitios de la cavidad oral humana.
- 29 **Tabla 2.** Caracterización fisicoquímica del xoconostle variedad Ulapa.
- 48 **Tabla 3.** Resultados fisicoquímicos de los extractos de rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle esterilizado por filtración y en autoclave.
- 49 **Tabla 4.** Cambios en el color de los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle esterilizado por filtración y autoclave.
- 50 **Tabla 5.** Compuestos bioactivos y actividad antioxidante en extractos de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle esterilizados por filtración y autoclave.
- 53 **Tabla 6.** Contenido de ácidos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) en extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle detectados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- 53 **Tabla 7.** Contenido de flavonoides ($\mu\text{g/mL}$) en extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle detectados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

RESUMEN

Los extractos naturales han sido empleados como agentes antimicrobianos ante un gran número de microorganismos patógenos, los extractos de los rizomas de la planta “sangre de drago” (*Jatropha dioica*) y del fruto del xoconostle "Ulapa" (*Opuntia oligacantha*) se encuentran entre estos agentes. Sin embargo, para incluirlos en formulaciones alimentarias o farmacéuticas es necesario eliminar su microbiota natural o adquirida durante el proceso de su extracción, mediante métodos de esterilización. Por otro lado, los efectos de la esterilización por filtración y autoclave sobre sus propiedades no han sido evaluados. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la esterilización por filtración y autoclave sobre las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas de los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle. Los contenidos de compuestos fenólicos, flavonoides, antioxidantes y actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* no se vieron afectados en los extractos esterilizados por autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago, además se detectaron los compuestos de naringenina, apigenina, galangina, ácido vanílico y ácido cafeico, mientras que en los extractos esterilizados por autoclave del fruto xoconostle el contenido de betalainas disminuyó y se identificaron los compuestos: galangina, ácido gálico, ácido vanílico y ácido p-cumárico. La concentración mínima inhibitoria para el extracto esterilizado en autoclave de la planta sangre de drago fue de 2 mg/mL, y para el extracto esterilizado por autoclave del fruto xoconostle fue de 28 mg/mL. Ambos presentaron ser alternativas naturales como agentes antimicrobianos contra *S. mutans*.

ABSTRACT

Natural extracts have been used as antimicrobial agents, and extracts of the rhizomes of the dragon's blood plant (*Jatropha dioica*) and of the fruit of xoconostle 'Ulapa' (*Opuntia oligacantha*) are among these agents. Prior to the use of the extracts, it is necessary to eliminate their natural microbiota by the means of sterilization by filtration and autoclave methods. However, the effects of thermal sterilization on the properties have not been evaluated. The objective of the study was to evaluate the effect of sterilization on the physico-chemical, antioxidant, and antimicrobial properties of extracts of the rhizomes of dragon's blood and the fruit of xoconostle. The contents of phenolic compounds, flavonoids, antioxidant, and antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* were not affected in autoclave-sterilized extracts of dragon's blood rhizomes. Naringenin, apigenin, galangina, vanillic, and caffeic acid were detected in dragon's blood rhizomes, while in autoclave-sterilized extracts of xoconostle fruits, the betalain content decreased, being galagin, gallic, vanillic, and p-coumaric acid identified. The minimum inhibitory concentration for the extract sterilized by autoclaving dragon's blood was 2 mg/mL, and for the extract sterilized by autoclaving xoconostle, it was 28 mg/mL. Both represent natural alternatives as antimicrobial agents against *S. Mutans*.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más comunes es la caries dental y 9 de cada 10 personas presentan problemas de salud bucal, dicha enfermedad se considera infecciosa y de origen multifactorial, se caracteriza por el reblandecimiento del tejido protector del diente evolucionando hasta formar una cavidad, la cual podría culminar con la pérdida de la pieza dental. Una caries mal tratada podría desencadenar problemas como endocarditis, problemas estomacales e incluso artritis reumatoide (Ojeda-Garcés et al., 2013). La formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) incluye a *Streptococcus mutans* como el agente más importante asociado a ella, éste produce ácidos cuando metaboliza carbohidratos fermentables, los cuales circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso generando la desmineralización de los dientes (Hung et al., 2005). *Streptococcus mutans* es una bacteria gram positiva involucrada en problemas de salud oral, es el responsable de la caries dental, así mismo desencadena otras enfermedades como la gingivitis y la periodontitis (Ojeda-Garcés et al., 2013).

Algunos de los agentes químicos comúnmente utilizados para controlar la caries y la gingivitis relacionados con *S. mutans* son la clorhexidina y el triclosán; sin embargo, el uso prolongado de estas sustancias suele provocar efectos secundarios como la coloración marrón en los dientes, alteración en el sabor o pérdida del sabor y lesiones escamosas en la mucosa alveolar (Bascones-Martínez y Mudarra-Morante, 2006). Actualmente, el uso de agentes antimicrobianos naturales con un rendimiento eficiente en la inhibición de microorganismos patógenos se ha convertido en una alternativa interesante, debido a los efectos secundarios causados por los antibióticos y al desarrollo de la resistencia bacteriana por parte de los microorganismos patógenos (Fernández-Riverón et al., 2003).

En este sentido, se encuentran cerca de 30,000 especies de plantas en México; de éstas, se considera que el 33% tiene propiedades medicinales y solo el 5% se han validado química, farmacéutica y biomédicamente (Benítez-Azaola et al., 2017; Waizel-Bucay y Martínez-Rico, 2011). De este 33% podemos encontrar varias plantas que crecen en forma silvestre, en regiones áridas y semiáridas de México. La tuna ácida o xoconostle ‘Ulapa’, es una fruta ácida del cactus conocido como nopal, y presenta propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas (Hayek y Ibrahim, 2012; Morales et al., 2012). Los

beneficios para la salud asociados con este fruto están relacionados con su contenido de fibra, fenoles, flavonoides, betaninas, vulgaxantinas y ácido ascórbico (Hernández-Fuentes et al., 2015). Morales et al. (2012) reportan un mayor contenido de ácido ascórbico en la pulpa, mientras que en las semillas el contenido de fenoles y flavonoides fue mayor. Por otro lado, Hernández-Fuentes et al. (2015) detectaron un alto contenido de fenoles totales de 278 mg de GAE/100g y una actividad antioxidante de 9.80 mmol de TE/100g en la pulpa xoconostle 'Ulapa'. Hayek e Ibrahim (2012), reportaron que los extractos acuosos de xoconostle presentan un efecto inhibitor a concentraciones del 10% (v/v) contra *E. coli* O157:H7. Sin embargo, el uso principal de xoconostle se encuentra en la cocina mexicana como condimento y en la elaboración de dulces, salsas y mermeladas de forma tradicional, haciéndolo un producto subutilizado con altas pérdidas postcosecha (Morales et al., 2012; Hernández-Fuentes et al., 2015).

Por otro lado, la planta *Jatropha dioica* conocida como sangre de drago, se ha empleado en la etnomedicina mexicana mediante la elaboración de infusiones de los tallos o masticación de rizomas para prevenir la movilidad dental y como analgésico para aliviar el dolor (Wong-Paz et al., 2010). Se ha demostrado que algunas especies de *Jatropha* mediante extracciones metanólicas de los rizomas, presentan actividad antiinflamatoria en roedores a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal (Mujumdar y Misar, 2004). Además, los extractos hidroalcohólicos de los rizomas de la planta sangre de drago presentan actividades antioxidantes y antimicrobianas a una concentración de 50 mg/mL contra hongos y contra bacterias gram positivas y gram negativas (Silva-Belmares et al., 2014; Wong-Paz et al., 2015). Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de *Jatropha dioica* están relacionadas principalmente con su contenido de compuestos fenólicos (Gutiérrez-Tlahque et al., 2018). Uno de los principales problemas que existen cuando al utilizar extractos naturales de plantas como agentes antimicrobianos es la microbiota nativa y la contaminación por hongos y mohos, probablemente durante la extracción de los materiales frescos, ya que las técnicas asépticas no se siguen durante los procesos de extracción (Hashemi et al., 2008). La esterilización en autoclave puede resolver este problema en los extractos de plantas (Hashemi et al., 2008). Sin embargo, el proceso de esterilización en autoclave utiliza altas temperaturas, lo que puede causar algunas modificaciones en los compuestos bioactivos de

los extractos de las plantas. En este contexto, muchos ingredientes funcionales, como los polifenoles y los flavonoides, son térmicamente sensibles y las cantidades de estos componentes activos que se encuentran en el proceso de desinfección y esterilización son importantes para el mantenimiento de sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, entre otras, que están relacionadas con los beneficios para la salud (Yin et al., 2018). Los extractos de xoconostle y de sangre de drago pueden ser una alternativa viable para el tratamiento frente a *Streptococcus mutans*, debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes; sin embargo, aún se desconoce si la esterilización en autoclave afecta las propiedades funcionales de estos extractos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la esterilización mediante autoclave sobre los componentes bioactivos de los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle, así como su capacidad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, para ser utilizados como ingredientes seguros y activos en productos de higiene bucal.

II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1 Enfermedades bucales

El consumo desmedido de alimentos con alto contenido de azúcares, texturas chiclosas, así como los malos hábitos de higiene bucal han contribuido a la aparición de problemas como la caries y gingivitis en las personas a temprana edad, los problemas de salud bucal suelen vincularse con afecciones cardiacas, infecciones pulmonares y se relacionan directamente con una mala nutrición (Portilla et al., 2010).

La placa dentobacteriana es un factor que determinará las enfermedades periodontales iniciando con la agregación de bacterias en la superficie dental (Zaura, 2004). Las bacterias que crecen en la placa dentobacteriana como el *Streptococcus mutans* son las responsables de los problemas de caries que a su vez puede desencadenar el desarrollo de gingivitis, trastorno de las encías y pérdida de los tejidos de soporte de los dientes (Portilla-Robertson et al., 2010). El *Streptococcus mutans* pertenece al grupo de bacterias lácticas y por tanto produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa o fructosa. La circulación de dichos ácidos desde la placa dental al esmalte poroso mediante disociación libera iones hidrógeno, disolviendo el mineral del esmalte, que genera calcio y fosfato difundiéndolos fuera del esmalte. A este proceso se le conoce como desmineralización (Hung et al., 2005).

La placa dentobacteriana es una placa visible que se deposita en la superficie de los dientes, formada por restos alimenticios, bacterias y desechos del metabolismo microbiano, los problemas comienzan cuando el equilibrio de la microbiota tiende a un incremento sobre las bacterias patógenas, generándose la caries, gingivitis o periodontitis (Ojeda-Garcés et al., 2013). En México, la caries dental afecta al 95% de los niños menores de 8 años de edad y a 99% de los adultos (Molina-Frechero et al., 2004). Las bacterias en la placa dental pueden alcanzar concentraciones de hasta 10⁸ UFC/mL, el 60% de las bacterias son cultivables, existen alrededor de 500 a 700 especies que pueden colonizar la mucosa y los dientes formando la placa dentobacteriana (Paster et al., 2006; Ojeda-Garcés et al., 2013).

El conocimiento actual sobre la estructura de la biopelícula dental es que las interacciones interbacteriales son facilitadas por un sistema circulatorio común en la biopelícula y el intercambio interbacterial establecido de productos metabólicos en un ambiente que está limitado en factores nutritivos. Datos recientes confirman que las bacterias en microcolonias de la biopelícula, bajo cierta densidad celular, pueden comunicarse a través de intercambio de información (percepción de *quorum*) por la expresión de genes, incluyendo genes de resistencia a los antibióticos. Las relaciones interbacteriales en la biopelícula de la placa dentobacteriana tienen el potencial de influir en la estructura bacteriana de la comunidad y estimular el crecimiento de ciertas especies e inhibición de especies concurrentes, estas interacciones pueden en gran medida determinar y afectar las relaciones entre los microorganismos y el huésped.

Con el avance del problema de caries dental se generan otros como la gingivitis, éste se caracteriza por ser un trastorno inflamatorio de las encías, a medida que avanza la inflamación su coloración se torna hacia un rojo azulado o azul oscuro, continúa con un incremento en la encía interdental y marginal, manifestándose un sangrado, no causa dolor y para la mayoría de personas que lo padecen pasa desapercibido, originando un proceso crónico por meses o años al cual se denomina periodontitis.

Las enfermedades periodontales son enfermedades multifactoriales, polimicrobianas, con diversos factores del huésped implicados en la determinación de la susceptibilidad individual a la enfermedad. La relación entre la microbiota periodontal y el huésped es generalmente benigna, pero cuando la especie bacteriana específica aumenta su concentración en los espacios subgingivales, puede causar inflamación periodontal, destrucción del tejido de soporte y óseo (Espejel et al., 2002; Popova et al., 2013).

La mayoría de los patógenos periodontales son anaerobios, pero la biopelícula dental también puede albergar aerobios facultativos, capnófilos (microorganismos que proliferan en presencia de altas concentraciones de dióxido de carbono) y microaerófilos cuyo número depende del entorno de la biopelícula desarrollada. Algunas especies bacterianas en el entorno periodontal que son parte de la flora comensal son *Actinomyces*, ciertos

Streptococcus y *Staphylococcus spp.* Pueden provocar infecciones oportunistas en caso de alteraciones en el ecosistema (Socransky and Haffajee, 2002; Popova et al., 2013). En la tabla 1 se muestran las bacterias encontradas en diversos sitios en la boca humana.

Tabla 1. Bacterias encontradas en distintos sitios de la cavidad oral humana.

Grupo bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco
<i>Estreptococcus</i>	27.9	38.3	41	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4	1.7
Cocos (+) anaerobios	12.6	4.2	13	7.4
Cocos (-) anaerobios	6.4	16	15.9	10.7
Cocos (-) facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos (+) facultativos	23.8	13	11.8	15.3
Bacilos (+) anaerobios	14.8	8.2	4.8	20.2
Bacilos (-) facultativos	ND	3.2	2.3	1.2
Bacilos (-) anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1

Los datos están expresados como porcentaje del recuento total cultivable incubadas anaeróbicamente en agar sangre. Los datos entre paréntesis son expresados como un porcentaje de los conteos totales de estreptococos facultativos. Fuente: Hamada y Slade (1980)

Las enfermedades gingivales pueden ser inducidas por placa y no inducidas por placa. Las lesiones gingivales no inducidas por placa son comunes y explican las reacciones tisulares periodontales observadas, en ocasiones la inflamación gingival difiere de las enfermedades gingivales asociadas a la placa con características clínicas distintivas. Las causas de las enfermedades gingivales no inducidas por placa incluyen infecciones bacterias, virales y micóticas, trastornos genéticos y enfermedades mucocutáneas. El cepillado dental traumático y reacciones alérgicas hacia medicamentos suelen ser otras posibles causas. Las lesiones gingivales asociadas a infecciones bacterianas afectan a pacientes con o sin inmunodeficiencia, las infecciones bacterianas dan lugar a lesiones gingivales, algunas de estas bacterias son: *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Streptococcus*, *Mycobacterium chelonae*. Se manifiestan en forma de úlceras con un color rojo intenso, edematosos, dolorosas, parches mucosos o gingivas inflamadas. Por otra parte, los traumas accidentales, iatrogénicos (daño a la salud por acto médico) y facticios (trastornos o

síntomas producidos deliberadamente por el paciente) pueden producir lesiones en los tejidos blandos orales, las lesiones químicas, físicas o térmicas son comunes en la boca. La lesión física puede ser autoinfligida, como resultado de traumas accidentales, infligencias premeditadas o hábitos crónicos, como el morderse las uñas, chuparse los dedos u objetos (Dilsiz et al., 2010). Un ejemplo de trauma físico que puede causar lesiones gingivales es el cepillado dental agresivo. La hiperqueratosis es una respuesta gingival cuando es limitado el traumatismo, mientras que la laceración gingival y pérdida del tejido puede deberse a traumas más violentos. Los movimientos bruscos con el cepillo, los dentífricos abrasivos y el uso del hilo dental pueden producir un trauma físico en la encía. Resulta complejo diagnosticar estas lesiones con una evaluación clínica.

Existen otras lesiones como las químicas, las cuales son causadas por compuestos antisépticos como la clorhexidina, siendo reversibles al retirar su uso. Las lesiones térmicas en la mucosa suelen ser causadas por bebidas o alimentos calientes, afectando mayormente al paladar y la mucosa labial, estas lesiones son dolorosas, causan enrojecimiento en la piel, pudiendo presentar vesículas, ulceraciones o erosiones de la mucosa. Los cuerpos extraños también pueden causar lesiones en la cavidad oral, por ejemplo: las amalgamas dentales en el tejido conectivo gingival. La pigmentación de la amalgama es un hallazgo común en la mucosa oral y la reacción del tejido puede variar considerablemente desde una respuesta inflamatoria crónica, generalmente en forma de una reacción de cuerpo extraño o no puede haber ninguna reacción (Parizi y Nai, 2010).

2.2 *Streptococcus*

El género taxonómico *Streptococcus*, los estreptococos, son un grupo de bacterias de la Clase *Bacili*, dentro del Filo *Firmicutes*. Su importancia para el ser humano recae en que algunas de las especies del género son causantes de enfermedades. Algunas de estas bacterias son causantes de fiebres reumáticas o de la escarlatina, además intervienen en varios procesos de infección de las vías respiratorias con neumonía (ocasionada, entre otras especies por *S. neumococcus* o en infecciones menos graves como las caries. No todas son conocidas por su capacidad de infectar al organismo, *S. thermophilus* se emplea en la

fabricación de lácteos, entre otras bacterias del género que intervienen en procesos de biotecnología. Algunas especies forman parte de la flora normal de algunos epitelios, como la piel, las mucosas del tracto respiratorio y la boca o el intestino (Paster et al., 2006; Ojeda-Garcés et al., 2013) Respecto a las enfermedades bucales, distintas investigaciones clínicas indican que la formación de placa es un requisito para generar la caries y enfermedades periodontales. Los estreptococos conforman el mayor número de bacterias presentes en la placa dental, dentro de las especies más importantes en el humano destacan el *mutans* y *Streptococcus sobrinus*, de acuerdo a su patogenicidad, respecto a la producción de caries en el esmalte por su capacidad de generar ácidos por la fermentación de sacarosa (Linossier y Valenzuela, 2011).

El *Streptococcus mutans* se puede clasificar en 8 serotipos de acuerdo a la composición y los enlaces de los polisacáridos de pared celular en: *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 downeil* (serotipo h). Se sabe que el serotipo c de *S. mutans* es el más predominante en la cavidad oral además de ser patógeno dental, causando bacteremia y endocarditis infecciosa (Nakano et al., 2004; Inaba y Amano, 2010).

La especie *mutans* juega un papel importante en la generación de caries, como en muchas enfermedades infecciosas, se requiere la colonización de un patógeno antes de que ocurra la infección, casi siempre acompañada de procesos inflamatorios. Existen diversos factores de virulencia para el establecimiento de *Streptococcus mutans* en la flora microbiana de la película dental, su papel en la etiología de la caries dental se ha investigado y demostrado su importancia, su desarrollo a edades tempranas se debe a que son capaces de colonizar superficies mucosas y puede colonizar la cavidad oral de los niños durante la erupción del primer diente, lo cual sugiere que su presencia puede contemplarse incluso antes de la erupción dental (Martínez, 2009).

En un estudio sobre la colonización por *S. mutans* en 46 niños estadounidenses, se evaluó el riesgo de adquirir *S. mutans* a temprana edad, desde su nacimiento hasta los 5 años, en donde

las madres portaban altos niveles de *S. mutans* y la ventana de infectividad fue definida como el periodo a partir de 19 a 31 meses de edad, tiempo en el que el riesgo de adquirir *S. mutans* fue elevado (Alves et al., 2009).

Las investigaciones han revelado un alto nivel de heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *S. mutans*. La heterogeneidad también puede observarse a nivel enzimático, en donde diferentes especies de *S. mutans* pueden producir distintas enzimas como la deshidrogenasa, glucosiltransferasas, aldosas e invertasas (Ojeda-Garcés et al., 2013).

La importancia de las glucosiltransferasas sobre el desarrollo de la placa dentobacteriana se debe a su absorción mediante la cual hay producción de glucanos (demostrado en estudios *in situ*) sobre el esmalte, proporcionando sitios de colonización, además de una matriz insoluble para la formación de la placa dentobacteriana, así también son absorbidas en las superficies de otros microorganismos orales para que estos produzcan glucanos y puedan adherirse. La estructura de la matriz de polisacárido cambia con el tiempo en consecuencia a la acción de las mutasas y dextranasas presentes en la placa dentobacteriana. Otros productos bacterianos han sido identificados mediante técnicas inmunológicas como la fructosiltransferasa, ácido lipoteicoico en películas formadas en estudios *in vitro* e *in vivo* a partir de saliva entera. Se ha comprobado la alta actividad de las enzimas en una amplia gama de valores de pH cuando estas se insolubilizan (Bowen y Koo, 2011).

Streptococcus mutans es capaz de adherirse a superficies incluso establecer interacciones con otros estreptococos y bacterias de otras especies, aglutinándose por la adición de dextranos de alto peso molecular. Dichos procesos son complejos implicando una gran variedad de componentes bacterianos y factores externos como la dieta (consumo de sacarosa) produciendo un medio acidogénico favorable para *S. mutans* y *S. albicans* (Martínez, 2009).

2.3 Enfermedad gingival inducida por placa: factores de riesgo

Este grupo de enfermedades es muy frecuente iniciándose por la presencia de la placa dental. Clínicamente existe una respuesta inflamatoria e inmune de los huéspedes a la placa

bacteriana, se caracteriza por presentar enrojecimiento, hinchazón y sangrado en el sondeo. Existen otros factores que pueden influir en los signos y síntomas como las enfermedades sistémicas, hormonas, genética, consumo de drogas y la desnutrición (Martínez, 2009; Spratt et al., 2012).

La clasificación de las enfermedades gingivales inducidas por placa se basa en la presencia de placa dental y los factores locales que influyen en el nivel de inflamación gingival. Factores modificadores locales: anatomía del diente, posición del diente, proximidad de la raíz, espacios abiertos entre dientes, anomalías de la raíz, restauraciones dentales, materiales de restauración empleados. La posición o inclinación de los dientes puede predisponer el periodonto a la acumulación de placa y la posterior inflamación. Si bien los estudios muestran que las áreas del periodonto adyacentes a los dientes mal alineados se pueden mantener en buen estado de salud, la enfermedad periodontal puede ocurrir si no se practica una buena higiene oral. En los niños, los valores del índice de placa y de inflamación gingival se han correlacionado con la falta de alineación. La proximidad de la raíz puede presentar un impedimento para la extracción de la placa autoejecutada o aplicada profesionalmente, incrementando el riesgo de inflamación gingival. Los alimentos ejercen un impacto siempre y cuando existan espacios abiertos entre los dientes, contribuyendo a la enfermedad periodontal. Los surcos palato-gingivales son anomalías del desarrollo que se observan principalmente en los incisivos maxilares. La presencia de un surco de la corona que se extiende en el margen gingival puede impedir la eliminación de la placa y permitir el acceso de los microorganismos al área subgingival. Las raíces proximales también se pueden encontrar en los dientes incisivos y premolares superiores. Estos surcos se han asociado con una mala salud periodontal y pueden aparecer en cualquier superficie dental. Las restauraciones deficientes con márgenes mal ajustados y aparatos de ortodoncia pueden influir negativamente en la salud de los tejidos gingivales adyacentes. Las restauraciones que violan el llamado "ancho biológico" pueden producir una respuesta inflamatoria que puede resultar en la pérdida de la unión del tejido conjuntivo y del hueso y la migración de la unión epitelial. En la mayoría de los casos, la cantidad de daño al periodonto está influenciada por la gravedad y la duración de la discrepancia marginal y la capacidad de los pacientes para mantener las áreas libres de placa. Se han reportado alergias a metales y

acrílicos comúnmente utilizados en restauraciones dentales (Blieden, 1999; Martínez, 2009; Spratt et al., 2012).

2.4 Etapas de la patogenia de la gingivitis

La patogenia de la gingivitis presenta tres etapas, la inicial, temprana y establecida. Lesión inicial: se caracteriza por presentar una inflamación aguada que puede ser inducida por los extractos de placa bacteriana sobre la encía normal. Lesión temprana: se caracteriza por infiltrado celular linfoide con predominio de linfocitos “T” característicos de las lesiones en los sitios de reacciones de hipersensibilidad mediada por células, puede inducirse al aplicar antígenos purificados a los tejidos gingivales en animales. Lesión establecida: existe predominio de linfocitos B y células plasmáticas y se establecen a medida que la condición clínica avanza o empeora, pueden permanecer estables por un tiempo o retroceder. Casi todas las lesiones son transitorias o persistentes, pero no progresivas. La pérdida de los niveles de inserción precede a la pérdida del hueso alveolar, sin manifestarse un problema de gingivitis como concurrente o precursora. Sin embargo, los estudios y evidencia indican que algunas lesiones por gingivitis pueden progresar a periodontitis, aunque ésta última puede ocurrir en individuos sin gingivitis. La periodontitis se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, de los microorganismos patógenos presentes destacan *Porphyromonas gingivalis*, bacteria que habita en la zona subgingival y tiene un rol importante en la etiología de la enfermedad periodontal, se nutre de líquido subgingival, que contiene proteínas carbohidratos y vitaminas, fomentando el crecimiento de esta bacteria y de la microbiota presente en el surco gingival. En la enfermedad periodontal se ven implicadas bacterias patógenas como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. viscosus* entre otras, induciendo reacciones con repercusión a nivel sistémico generando procesos patognomónicos afectando la salud oral e incluso la salud en general del huésped, dicha condición requiere un tratamiento extenso y costoso (Jelvehgaran et al., 2014).

2.5 *Porphyromonas gingivalis*

Es una bacteria patógena en forma de cocobacilo, Gram negativo, mide 0.5 a 0.8 μm , no esporulado, con abundantes fimbrias de diferentes tipos, no presenta flagelos, anaerobio estricto, muchas cepas son capsuladas, se considera un comensal en la cavidad oral, presenta endotoxinas en su pared celular a nivel de membrana externa, presenta vesícula (contiene gran variedad de enzimas importantes en su virulencia) a nivel superficial y produce una gran variedad de enzimas que degradan compuestos proteicos (Kerr et al., 2014). Los factores patogénicos de *Porphyromonas gingivalis* incluyen componentes de la pared celular, estructuras facultativas y productos de secreción (Orrego-Cardozo, et al., 2015). La cápsula es un gen codificante de epimerasa, constituido por polisacáridos, su papel se vincula con la evasión del sistema inmunológico evitando procesos como la fagocitosis y reduce la respuesta pro-inflamatoria. Las cepas no capsuladas causan abscesos localizados no invasivos, mientras que las capsuladas son invasivas. La endotoxina se encuentran sobre la membrana externa de la pared gram (-), participa en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped, ocasiona inflamación gingival con destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar debido a la activación de los osteoclastos causando la liberación de prostaglandinas E, además pueden migrar hacia otros tejidos a través de la circulación y ocasionar patologías como aterosclerosis, nacimientos prematuros, enfermedades o alteraciones cardiovasculares y respiratorias (Ramos-Perfecto, et al., 2011). Las vesículas de la membrana externa son sacos cerrados situados externamente en la bacteria, presentan diversas enzimas como; fosfolipasas C, proteasas, fosfocatalasa alcalina, hemolisina, lipopolisacáridos. Estas son liberadas afectando a los neutrófilos y células periodontales y sirven como puente de coagregación y son importantes en la colonización de la cavidad oral. Cuando las vesículas de la membrana externa de *P. gingivalis* se secretan, éstas entran a las células epiteliales del hospedero a través de endocitosis. Las hemaglutinas promueven la colonización por mediación de la unión bacteriana hacia receptores de oligosacáridos en células humanas. Las fimbrias son apéndices filamentosos adhesivos de naturaleza proteica, su forma es peritrica, se conforman por monómeros de fimbriolina con seis variantes, las cuales presentan la capacidad de unión a distintos sustratos, moléculas y células, como epitelial, fibrinógeno, fibronectina,

lactoferrina. Además, presentan propiedades de inducción de citoquinas y quimiotácticas. Debido a la diversidad genética de *P. gingivalis* puede intercambiar ADN cromosómico con otras cepas mediante procesos de conjugación y de competencia natural, debido a ello es posible el intercambio de los genes fimA generando cambios fenotípicos como el incremento en la cantidad de fimbrias sintetizadas y procesos de agregación, favoreciendo su patogenicidad (Kerr et al., 2014).

2.6 Fisiopatología

Se considera un colonizador secundario, comensal del surco gingival (*P. gingivalis*), su contagio es por transmisión de individuos infectados, mediante la saliva, su capacidad de adherencia le permite colonizar el surco, adaptándose e invadiendo las células epiteliales en un tiempo de 20 min, replicándose al interior de ellas diseminándose a las células de su alrededor. Su capacidad de evasión de las defensas del huésped, su capacidad de degradar distintas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar se deben a que son capaces de invadir las células y a sus factores de virulencia. La presencia de esta bacteria activa una cascada de respuestas que pueden incrementar el proceso de inflamación, haciendo crónico el proceso de destrucción del periodonto.

2.7 Aislamiento

P. gingivales es anaerobio estricto, predominante en las bolsas periodontales en el biofilm subgingival, una vez tomada la muestra se lleva a un medio de transporte como VMGA-III, BHI Tioglicolato para posteriormente ser sembrado en medios enriquecidos como en Agar sangre suplementado, la incubación se realiza a 37 °C de 7 a 14 días en condiciones de anaerobiosis (Cámara, jarra o sobres de anaerobiosis). Las colonias presentan tamaños de 1-2 mm, con forma redonda, convexa y pigmentada de un color marrón a negro. La tinción gram debe evidenciar una morfología cocobacilar y ser negativa (Ramos-Perfecto et al., 2014).

2.8 Tratamiento de la caries: Dentífricos

La boca es una vía de contacto entre nuestro organismo y el medio exterior, el estado de salud frecuentemente se relaciona con la salud bucal. En el tratamiento de caries y las enfermedades gingivales, la inflamación puede disminuir significativamente con la remoción del biofilm subgingival, la aplicación de técnicas como el cepillado manual convencional y la administración de enjuagues con antimicrobianos como la clorhexidina. Los enjuagues bucales o colutorios son soluciones empleadas después del cepillado con el fin de eliminar la placa dental (causante de la caries). Existen diferentes enjuagues, cuyo efecto varía en función de su composición. Los colutorios son ricos en flúor y se emplean para la prevención de la caries, son eficaces durante la calcificación del diente. Otros enjuagues están específicamente indicados para combatir y eliminar la placa bacteriana y la halitosis. La eliminación mecánica de la placa dentobacteriana es una técnica básica empleada para evitar las enfermedades dentarias y conservar la salud bucal (el cepillado). No obstante, existe un gran interés por los métodos químicos de control de placa (los enjuagues o colutorios).

De acuerdo a la American Dental Association, existen dos tipos de enjuagues bucales: los terapéuticos, cuyo fin y dependiendo de su composición es ayudar a reducir la placa dental y evitar la aparición de caries y gingivitis. Por otra parte, los enjuagues cosméticos son aquellos que pueden controlar o disminuir temporalmente el mal aliento, dejando en la boca con un sabor agradable, sin solucionar las causas del mismo, no reduce la placa dental, ni la gingivitis o la caries (Cummins y Creeth, 1992).

Los enjuagues bucales contienen agentes antimicrobianos como el gluconato de clorhexidina (agente quimioproláctico), efectiva para los tratamientos periodontales, el cual actúa sobre la inhibición de la formación de placa dentobacteriana (PDB) por dos mecanismos: reducción de la colonización de PDB y por la unión a grupos de ácidos aniónicos de las glucoproteínas salivales, reduciendo el grosor de la placa. La clorhexidina presenta acción antiinflamatoria por su poder detergente y antioxidante, inhibe la capacidad de las bacterias de activar el metabolismo oxidativo de los neutrófilos impidiendo la liberación de enzimas que participan

en el proceso inflamatorio. La clorhexidina es un compuesto poco soluble en agua, puede presentar problemas de incompatibilidad con algunos ingredientes, en estado puro tiene sabor amargo y en concentraciones elevadas puede provocar tinciones en la superficie dental. Otro compuesto ampliamente utilizado es el triclosán, el cual presenta propiedades antisépticas, su sabor no es desagradable, no provoca tinción dental y es poco soluble en agua. El formaldehído es un compuesto que ha sido reemplazado por presentar efecto toxicológico, su empleo es a concentraciones de 0.5% (Roldán et al., 2005).

El mecanismo mediante el cual una bacteria es capaz de resistir la acción de agentes antimicrobianos se le denomina resistencia. Clínicamente una bacteria es sensible a un agente antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es 4 veces superior a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Concentraciones por debajo de la CMI califica a la bacteria como resistente, mientras que para los valores intermedios como de sensibles moderadamente. Resistencia y sensibilidad son términos relativos dependiendo del valor de la localización de la infección, así como de la dosis y vías de administración del agente antimicrobiano. Los tipos de resistencia son: natural o intrínseca: la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación y la resistencia adquirida en donde la transferencia de genes se realiza horizontalmente mediante el uso de plásmidos u otro material genético movable. Las bacterias han desarrollado mecanismos de acción ante los antibióticos, uno de ellos es la expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora utilizada por las bacterias para la excreción de productos residuales mediante la cual es posible eliminar a los agentes antibacterianos. El segundo se lleva a cabo por un cambio en la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, modificando los canales de entrada (porinas). El tercer mecanismo se relaciona con la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos. De esta manera se pueden inhibir los aminoglucósidos, el cloranfenicol por el acetil transferasa entre otros. Algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial, produciendo resistencia bacteriana cuando se modifica la proteína diana y se cambia la función o se producen distintas enzimas (Fernández-Riverón et al., 2003).

La búsqueda para mejorar los métodos de higiene oral evitando los efectos secundarios en los pacientes ha permitido estudiar la alternativa de los enjuagues bucales a base de sustancias químicas naturales. Los productos naturales (como enjuagues o infusiones) tienen efectos satisfactorios y han mostrado ser una alternativa a los agentes sintéticos antibacteriales, contribuyendo a mejorar el acceso de la población a la atención con prevención y tratamiento de enfermedades bucales (Venancio et al., 2015). De esta manera es posible encontrar compuestos que son capaces de actuar sobre la placa dental y diseñar productos. Existen reportes sobre compuestos de origen natural (plantas y frutos) con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, cicatrizantes y antioxidantes, los cuales podrían ser una excelente alternativa a los compuestos químicos empleados en los dentífricos, el uso desmedido de éstos últimos ha generado resistencia por parte de los microorganismos patógenos que se encuentran en la microbiota bucal, además que éstos no son selectivos y barren con los microorganismos benéficos. La alta prevalencia de las enfermedades orales ha generado la constante búsqueda de fuentes de agentes antimicrobianos viables; como alternativa han sido utilizados los extractos naturales en etnomedicina, debido a la presencia de compuestos bioactivos. Esto hace que los extractos naturales sean vistos como una opción en el tratamiento y prevención de enfermedades bucales (Contreras-Rosales et al., 2014).

2.9 Compuestos con propiedades antimicrobianas

Los compuestos con poder antimicrobiano son compuestos químicos añadidos en los productos que tienen la función de retardar o eliminar el crecimiento microbiano por distintos mecanismos de acción (López-Malo, 2000). La actividad microbiana no se atribuye a un mecanismo específico, pero existen reportes sobre los sitios de acción en la célula en donde puede ocurrir el daño como en la membrana citoplasmática, inactivación enzimática, alteración del material genético, degradación de la pared celular, daño en las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y pérdida de la fuerza motriz de la célula (Skandamis y Nychas, 2001). Algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados de forma individual, en estos casos puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el

espectro de cobertura en su acción (Rodríguez-Sauceda, 2011). Es por todo lo anterior el gran interés en el estudio de los extractos de origen natural que contienen gran diversidad de componentes bioactivos con propiedades antimicrobianas.

Muchos de los agentes con poder antimicrobiano producidos de forma sintética se encuentran también de forma natural, éstos pueden clasificarse como aditivos con acción directa o indirecta. Como ejemplo de los aditivos antimicrobianos con acción directa se incluyen los nitritos y nitratos, sorbatos, benzoatos, así como ésteres, fenoles, ácidos orgánicos, entre otros. Los agentes antimicrobianos con acción indirecta son añadidos con objetivos distintos a la acción antimicrobiana, como lo son los antioxidantes fenólicos y fosfatos, por citar algunos (Davison y Branen, 1993). Existe una gama amplia de compuestos con poder antimicrobiano de origen natural presentes en las plantas, hierbas, especias y frutos, entre los compuestos encontrados se cita la presencia de manera amplia de compuestos fenólicos, los cuales han sido empleados en la etnomedicina para elaborar productos bucales que evitan problemas como la movilidad dental, inflamación de las encías o sangrado, así como para la limpieza de los dientes.

Las aplicaciones de los antimicrobianos de origen natural respaldan su acción en diversos estudios *in vitro* y en medios microbiológicos. Las pruebas *in vitro* proporcionan información sobre la efectividad de un compuesto. Algunos factores intrínsecos y extrínsecos o variables asociados a la aplicación de los agentes antimicrobianos son la temperatura, atmósfera, pH, potencial de óxido-reducción y actividad de agua. De acuerdo con Holley y Patel (2005) la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos puede ser afectada por la presencia de lípidos, proteína, concentración de sales, pH y temperatura (Nychas, 1995).

Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad antimicrobiana se dividen en pruebas *in vitro* y pruebas de aplicación. Éstas últimas, también se conocen como “métodos de barrido” y pueden incluir cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al producto; este tipo de pruebas, proveen información preliminar para determinar la eficiencia del compuesto (Rodríguez-Sauceda, 2011).

La rapidez del efecto bactericida de los agentes antimicrobianos puede determinarse por el análisis de tiempo de cultivo después de adicionar el componente para graficar los valores obtenidos respecto al tiempo, también se pueden utilizar técnicas de microscopía electrónica para observar el daño en la pared celular y la pérdida del contenido celular originado por el poder antimicrobiano de los componentes (Lamber et al., 2001). Un método ampliamente utilizado para la evaluación de los antimicrobianos naturales es el conocido como “zona de inhibición” (Zaika, 1988), es un método sencillo, en donde el efecto inhibitorio del compuesto a evaluar dependerá de su habilidad para difundirse en el medio, a este método también se le conoce como “ensayo de disco” (Davidson y Parish, 1989).

2.10 Actividad antimicrobiana de compuestos naturales

Las sustancias bioactivas son componentes producidos en los organismos vivos que influyen en la actividad celular, en los mecanismos fisiológicos y su consumo resulta beneficioso para la salud. Los compuestos químicos como los hidratos de carbono, proteínas, lípidos, entre otros, son utilizados por el hombre, conocidos como metabolitos primarios vitales, indispensables para el crecimiento o reproducción, también se encuentran los metabolitos secundarios que son producidos por el conjunto de reacciones bioquímicas de forma paralela al metabolismo primario, éstos no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción, sin embargo cumplen funciones complementarias a las vitales, las investigaciones demuestran que su consumo aporta grandes beneficios sobre la salud, por citar algunos podemos nombrar a los compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides (Paul y Dewick, 2009; Haslam, 1986).

La producción de metabolitos secundarios está influenciada por tres factores: Analogía estructural (quimiotaxonomía), Ontogenia (estado de desarrollo) y Factores ambientales. Un componente bioactivo es aquel que aporta un beneficio a la salud más allá de los considerados como nutrición básica, generalmente se encuentran en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal.

Las plantas y frutos con propiedades funcionales siguen siendo una fuente primordial en la búsqueda de nuevos componentes para prevenir y/o tratar enfermedades, estos productos

contienen compuestos orgánicos que constituyen a los metabolitos secundarios; por ejemplo: aceites esenciales, ácidos orgánicos, alcaloides, carotenos, fenoles, fitoesteroles, flavonoides, glicósidos, lactonas, lignanos, mucílago, pectinas, polisacáridos, quinonas, saponinas, taninos, terpenos, entre otros, los cuales poseen diferentes actividades como: antiglicolíticas, antimicrobianas, propiedades antiinflamatorias, antihemorrágicas, antioxidante, anticancerígeno, hipocolesterolemiante, inmunomodulador, antitrombótico, antihipertensivo, hipoglucémico, entre otros (Serran et al, 2013).

El β -sitosterol es producido en el metabolismo secundario de las plantas y se ha demostrado que atribuye propiedades antimicrobianas en los extractos de plantas donde se encuentra presente. Otros compuestos con propiedades antimicrobianas son los compuestos fenólicos como el ácido cafeico, clorogénico, p-cumárico, ferúlico y quínico presentes en diferentes partes de las plantas. La actividad antimicrobiana de esos y otros ácidos como hidroxicinámico y cinámico pueden retardar la invasión microbiana y la putrefacción de frutas y vegetales, existen reportes que señalan la sensibilidad de bacterias Gram positivas, Gram negativas, mohos y levaduras a los compuestos derivados de ácido hidroxicinámico (Rodríguez-Sauceda, 2011). Los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico, inhiben el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* (Dadvison, 2001; Rodríguez-Sauceda, 2011).

Otros compuestos fenólicos que han demostrado tener actividad antimicrobiana son los taninos y el ácido tánico. Este último inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *A. hydrophila* y *S. faecalis* (Beuchat, 2001). Los compuestos fenólicos como los flavonoles, presentes en frutas y en el té verde, presentan actividad antibacteriana. El aldehído cinámico es otro componente que presenta efecto antimicrobiano, es utilizado en la pasta de pescado. El aldehído cinámico es efectivo contra mohos y levaduras a pH ácidos, se ha reportado que contiene un antimicótico natural que inhibe la producción de aflatoxinas (Hitokoto, 1978). El ácido cinámico y los derivados del aldehído se encuentran presentes en algunas plantas y frutos, son metabolitos secundarios con acción protectora natural en contra de infecciones y microorganismos patógenos (Mazza, et al., 1993; Davidson, 1997).

Por otro lado, no solo las plantas contienen componentes capaces de generar beneficios a la salud, también existen frutos con una alta concentración de compuestos bioactivos, los cuales generarían una excelente opción ya que la gran mayoría de estos frutos presentan un bajo consumo en fresco, además de elevadas pérdidas poscosecha anuales.

Existen algunas investigaciones en donde se ha estudiado la estabilidad de compuestos naturales en la elaboración de productos para higiene bucal, las características evaluadas van desde propiedades organolépticas, sedimentación, pH y densidad (Venancio et al., 2015). Rencas y Muralidharan (2017) señalan que el empleo de mezcla de extractos naturales mantiene una buena higiene oral, disminuyendo los índices de placa y gingival, pero a pesar de ello su efectividad no es equiparable con la que presenta la clorhexidina durante los tratamientos de gingivitis y periodontitis. Estudios *in vitro* con extractos de *Camellia sinensis* han demostrado capacidad para evitar la formación de placa bacteriana e incorporado el extracto en un colutorio (estudios *in vivo*) mostró efecto antibacteriano vinculado a la presencia de compuestos como los polifenoles (catequinas), pese a ello los autores sugieren mayor investigación sobre la elaboración del enjuague con distintas concentraciones y evaluar la frecuencia de su uso (Moromi et al., 2007). Algunos otros extractos naturales estudiados han sido *Boswellia serrata* y *Nigella sativa* en estudios *in vitro* contra *Agregatibacter actinomycetemcomitans* principal agente etiológico de formas agresivas de periodontitis (patógeno oportunista) obteniendo efecto positivo sobre su reducción. Pimentel-Ramirez et al. (2015) evaluaron diferentes extractos etanólicos de plantas como el orégano (*Origanum vulgare*), chincho (*Tagetes elliptica*) y huacatay (*Tagetes minuta*) frente a la cepa *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277) comparada con clorhexidina al 0.12% y Colgate plax, en donde encontraron que los extractos naturales presentaron un efecto similar al enjuague bucal Colgate Plax en los resultados de los diámetros de halos de inhibición (MIC de 125 mg/mL).

En México existen un sinnúmero de frutos y plantas poco valoradas y estudiadas, además de ser nativas, la mayoría presentan propiedades funcionales, suelen ser poco sobreexplotados y se limitan al consumo regional o en la elaboración de productos de forma tradicional como: licores, dulces, jaleas, salsas, enjuagues, ungüentos, infusiones, entre otros.

2.11 Planta sangre de drago (*Jatropha dioica*)

Existen un gran número de plantas medicinales en México empleadas para prevenir y tratar diversas enfermedades, su efecto benéfico se debe en gran parte a la presencia de componentes bioactivos con efecto en la salud, tal es el caso de la planta sangre de drago (*Jatropha dioica*), la cual ha sido utilizada contra enfermedades como el cáncer, gastrointestinales, infecciones de mucosa o cavidad oral y oro faríngeo como gingivitis (sangrado de encías) además se emplea como antiviral, antimicótica, antibacteriana y cicatrizante (Pérez-Escandón et al., 2003; Can-Ake et al., 2004; Thomas et al., 2008; Wong-Paz et al., 2010). La planta *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var 'dioica' o mejor conocida como sangre de drago, proviene del griego *Jatros* que significa doctor y *Trophe* que significa alimento, en México existen 45 especies, de las cuales el 77% son endémicas (Martínez-Gordillo et al., 2002). Perteneciente al dominio Eukarya de la división Magnoliophyta, orden Euphorbiales (Rignanese, 2006). Es un arbusto perenne escasamente leñoso con alturas que van desde los 30 cm hasta los 150 cm. Forma colonias por la presencia de rizomas o tallos subterráneos semileñosos que se orientan hacia el exterior, los cuales son flexibles y de coloración negro-rojizo. Los rizomas al ser cortados segregan un látex incoloro que al entrar en contacto con el aire se torna de color rojo semejante al color de la sangre, de ahí el nombre de sangre de drago (Martínez et al., 2014).

Su época de floración es en los meses de abril y mayo. Se localiza en el estado de Hidalgo específicamente en la región del Valle del Mezquital, en los municipios de Ixmiquilpan, el Cardonal (San Antonio Sabanillas y Cardonal) y Meztlán; en Ixmiquilpan elaboran un champú a base de sangre de drago para prevenir la caída del cabello (Manzanero-Medina, et al 1996; Filardo-Kerstupp et al., 2006; Argueta y Zolla, 2009). Otros estados donde se reporta su presencia son Durango, Zacatecas, Chihuahua, San Luis Potosí, Tamaulipas y Puebla, en donde su uso se restringe como planta medicinal (Flores y Jurado, 2003; Sosa et al., 2006; Villareal et al., 2011).

Existen algunos trabajos de investigación donde se comprueba el efecto de los extractos de sangre de drago con usos medicinales: tratamiento contra la caída del cabello, acné, sangrado

de encías, prevención de enfermedades periodontales, propiedades antioxidantes, antitumorales, antimicrobianas, tratamiento contra el asma y propiedades cicatrizantes (Pérez-Escandón et al., 2003). Las investigaciones señalan la presencia de metabolitos secundarios como los alcaloides, terpenos (diterpenos), lignanos y péptidos cíclicos, flavonoides y fitoesteroles (Can-Ake et al., 2004; Thomas et al., 2008). Su empleo como antimicrobiano para el control de microorganismos patógenos bucales proviene de los metabolitos secundarios, específicamente de flavonoides y terpenos, los cuales forman parte de los mecanismos naturales de defensa de la planta, dicha actividad se ha demostrado en pruebas *in vitro*, invernadero y campo (Wong-Paz et al., 2010).

El mayor constituyente de la planta sangre de drago es el β -sitosterol (> 90%) y en el caso de las especias nativas de México diversos estudios han reportado que no presentan citotoxicidad (Silva-Belmares et al., 2013). Existen investigaciones que demuestran las propiedades antiinflamatorias de componentes presentes en la raíz y tallo de la planta sangre de drago vinculada con la presencia de ácido linolénico y oleico, D-amirinas, D-sitosterol, stigmasterol, taraxasterol, vitexina y taninos (Waixel-Bucay y Martínez-Rico, 2011). Villareal-Treviño et al. (2006) utilizaron extractos de *Jatropha dioica* para tratar pacientes adultos con periodontitis, evaluando la actividad antimicrobiana del extracto de las bacterias aisladas de los pacientes, sobre 6 cepas aerobias y anaerobias facultativas (*Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Branhamella*, *Streptococcus intermedius* y *Actinomyces israelí*). Hallaron una concentración mínima bacteriana de 0.6 mg/mL y 0.8 mg/mL para *Bacillus* y *Streptococcus spp*, respectivamente, mientras que *Actinomyces israelí* y una *Enterobacteria* mostraron susceptibilidad a 4 mg/mL, *Estreptococcus intermedius* fue inhibida a 5 mg/mL y para *Staphylococcus* fue de 7 mg/mL. Concluyendo que los extractos utilizados tienen un alto potencial como agentes antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades periodontales como sustituto de los fármacos empleados actualmente.

Estudios de la aplicación de extractos alcohólicos de la planta sangre de drago en pacientes con movilidad dental, demostraron una reducción de movilidad de hasta de un 80%, el periodo de estudio fue de 6 meses en donde se utilizaron radiografías para corroborar los resultados (Argueta y Zolla, 2009). Algunos de los diterpenos encontrados en *Jatropha*

dioica son: riolozatriona, con presunta actividad antiinflamatoria; citlalitriona aislada de la raíz y tallo, con efecto antitumoral, jatrofholona Beta, β -sitosterol, su concentración varía dependiendo de la especie (Klippel et al., 1997).

En extracciones metanólicas de la planta sangre de drago, se ha comprobado su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii* (Argueta y Zolla, 2009). Un estudio realizado en la raíz reporta la obtención de un aceite esencial, resinas, saponinas, alcaloides y ácido oxálico, que poseen una fuerte actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (García-Hernández et al., 2006).

En estudios realizados por López-Ibarra y Mendoza-Moreno (2000) demostraron que la concentración de taninos es mayor en los rizomas que en el tallo y ésta a su vez resulta ser mayor en la corteza que en la madera, además, se ha reportado que las especies encontradas en México no presentan toxicidad en su consumo, tema que necesita un mayor número de investigaciones (pruebas *in vitro* e *in vivo*) para asegurar su consumo y dosis de los componentes bioactivos. Los beneficios y usos de los extractos de la planta sangre de drago de acuerdo a la revisión de los estudios reportados, contribuiría como una alternativa a los compuestos sintéticos empleados en productos de carácter funcional con un beneficio a la salud.

2.12 Fruto xoconostle

El nopal o cactus (*Opuntia spp*) pertenece a las cactáceas endémicas de América. Las cactáceas han tenido gran relevancia en nuestro país debido a sus múltiples usos e investigaciones realizadas. Su gran resistencia a sequías por su grado de adaptación y metabolismo hace que sus frutos persistan al deterioro. Su crecimiento es en condiciones semiáridas y se localizan en la zona centro y norte del país (Gallegos-Vázquez, 2012). Algunas especies del género *Opuntia* producen frutos con pulpa abundante y sabor dulce y en minoría otras especies producen frutos ácidos (pH de 3.5-4.5) como el xoconostle (Gallegos-Vázquez et al., 2012; Bravo-Hollis, 1978). El fruto xoconostle ha reportado

actividad antioxidante, antiglicémica y antimicrobiana debido a la presencia de flavonoides, betacianinas, fenoles, y fibra soluble como mucílago (Cassiana et al., 2010; Hernández-Fuentes et al., 2015; Morales-Luna et al., 2012; Osorio-Esquivel et al., 2011). En las comunidades donde se cultiva resulta ser una fuente de ingresos; desafortunadamente son altas las pérdidas poscosecha, la calidad y presentación del fruto juegan un papel primordial en su comercialización, además de ser altamente perecedero (Mondragón, 1993). Este fruto es poco industrializado y genera una opción viable como aditivo o producto funcional para su procesamiento en la industria alimentaria en México.

Existen 50 especies reconocidas de xoconostle, también existen otras especies no reportadas que son endémicas de México, la fruta del xoconostle puede ser verde pálida, rosa o roja; este fruto sólo se cosecha en los meses de octubre a febrero. En México se cultivan cerca de 45,000 hectáreas de nopal tunero, con 20,000 productores, siendo los estados de México, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla donde la concentración de producción es mayor (90%) (ASERCA, 1999 y Ventura y Pimentel, 1994). En la figura 1 se puede observar la composición del fruto xoconostle mediante un corte longitudinal, se encuentra compuesto por un epicarpio (piel), mesocarpio (contiene la pulpa) y endocarpio (principalmente semillas), la parte del mesocarpio que contiene la pulpa es la parte comestible del fruto y es utilizada para preparar productos regionales (Gallegos-Vázquez et al., 2012). El fruto presenta azúcares reductores, proteínas, vitamina C, carotenoides, betacianinas y compuestos fenólicos (Pinedo-Espinosa et al., 2014; Osorio-Esquivel et al., 2011).

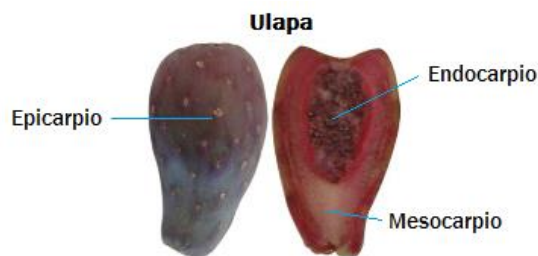


Figura 1. Corte longitudinal de xoconostle variedad Ulapa.

Morales et al. (2011) realizaron estudios en el fruto xoconostle variedad Ulapa reportando un contenido de fibra del 30-34% en la pulpa, la cual está compuesta por mucílagos y pectinas principalmente y su consumo se encuentra vinculado con un beneficio a la salud, además se evaluaron las propiedades antioxidantes y nutricionales del xoconostle, concluyendo que el fruto puede ser considerado como una fuente de compuestos bioactivos como aditivo en productos alimentarios.

Otros estudios señalan al xoconostle como fuente potencial de inhibidores de tripsina y como agentes de control de plagas (Aguirrezabala-Campano et al., 2013). Las propiedades nutricionales, fisicoquímicas y funcionales varían dependiendo el genotipo estudiado (Hernández-Fuentes et al., 2015). En la tabla 2 se muestran las propiedades del xoconostle variedad 'Ulapa', de acuerdo a su clasificación taxonomía es *Opuntia oligacantha* (Förster), originario de Tezontepec de Aldama, ubicado en el Estado de Hidalgo, siendo una especie semi-doméstica.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del xoconostle variedad Ulapa.

Parámetros evaluados	xoconostle Ulapa
Sólidos solubles (°Brix)	5.36 ± 0.11
Acidez titulable (g ácido cítrico/100 g ⁻¹)PF	0.13 ± 0.001
pH	3.20 ± 0.07
Proteínas (g 100 g ⁻¹) PF	0.60 ± 0.06
Lípidos (g 100 g ⁻¹) PF	0.024 ± 0.002
Total de carbohidratos y cenizas (N. libre de extracto)(g 100 g ⁻¹) PF	9.49 ± 0.10
K	0.191 ± 0.012
Ca	0.368 ± 0.012
Mg	0.096 ± 0.003
Fe	0.17 ± 0.0010
Zn	0.008 ± 0.0001
Fenoles Totales (mg GAE 100 g ⁻¹)	278 ± 2.2
Betacianinas (mg 100 g ⁻¹)	0.76 ± 0.36
Vulgaxantina (mg 100 g ⁻¹)	4.50 ± 0.36
Actividad antioxidante (mmol TE 100 g ⁻¹)	9.80 ± 0.22

PF: peso fresco; GAE: equivalentes de ácido gálico.

Fuente: Hernández-Fuentes et al. (2015).

Morales et al. (2014) realizaron la identificación de los compuestos bioactivos, detectando la presencia de componentes fenólicos en el epicarpio y mayormente en el endocarpio, el perfil

de estos compuestos se observó a una longitud de onda de 370 nm, encontraron 16 compuestos, incluyendo al ácido fenólico, 14 flavonoides y betacianinas.

No hay reportes de estudios antimicrobianos de extractos de xoconostle sobre cepas patógenas orales, sin embargo, las propiedades antibacterianas han sido evaluadas en bacterias gram positivas y negativas, concluyendo que su efecto inhibitorio depende de su concentración. Hayek y Ibrahim (2012) evaluaron el extracto acuoso del fruto xoconostle sobre 4 cepas de *E. coli* teniendo un efecto inhibitorio a concentraciones del 10%. Por ello la presente investigación propone como antimicrobiano a los extractos del fruto xoconostle frente a cepas patógenas orales.

2.13 Métodos de esterilización y su impacto sobre compuestos bioactivos

La esterilización por definición es el conjunto de operaciones destinadas a eliminar todas las formas viables de microorganismos, contenidos en un objeto o sustancia. El conocimiento del modo de acción de un método permite predecir las condiciones en que será más eficaz, así como su espectro antimicrobiano. Los posibles puntos de ataque son: Lesiones de la pared celular, alteración de la permeabilidad de la membrana celular, alteración de la naturaleza coloidal del protoplasma, interacción con las proteínas, enzimas y/o ácidos nucleicos bacterianos. Si el agente es físico los factores que influyen en la destrucción de microorganismos son: intensidad, el tiempo durante el cual puede actuar, la temperatura y humedad. En cuanto al microorganismo se debe tener en cuenta el número de ellos, si están en estado vegetativo o esporulado y el ambiente que lo rodea (La forma vegetativa tiene una gran sensibilidad a la acción de los agentes físicos y químicos) (Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1999; Davidov-Pardo et al., 2011). Las esporas microbianas son formas de resistencia a esos agentes; por lo tanto, todo proceso de esterilización será correcto cuando elimine las formas de resistencia de cualquier microorganismo. La carga biológica es el número de microorganismos existentes en el material a esterilizar. En general se determinan los microorganismos viables y el número de esporas. La determinación de la carga biológica influye directamente en el Índice de seguridad de la esterilización (Pokorný, 2003; Bascones-Martínez y Mudarra-Morante, 2006).

En los métodos existentes destacan los de vapor saturado a presión, en donde la gente esterilizante es el vapor a presión, exento de aire u otros gases, que hidrata las bacterias y favorece su coagulación. Esto se consigue por medio de aparatos denominados autoclaves. Las primeras autoclaves requerían de ciclos muy largos, pero actualmente se han introducido muchas innovaciones que hacen de este método de esterilización se más apropiado para una gran diversidad de materiales. Hoy en día todas las autoclaves están automatizadas y registran gráficamente las variables de temperatura vs. tiempo de cada ciclo. Los ciclos en autoclave constan de las siguientes fases: Fase de calentamiento, que es el tiempo en el cual se incrementa la temperatura, este depende de la masa y el volumen de la carga, la disposición y del suministro de vapor. Previamente se debe eliminar totalmente el aire y otros gases no condensables. Si existe aire dentro de la cámara, aunque transcurra el tiempo necesario nunca se llegará a la temperatura prefijada. Fase de exposición, es la fase de muerte de los microorganismos, por lo tanto, es función de la carga bacteriana inicial, la resistencia de los microorganismos y el grado de reducción de la población inicial que se pretende alcanzar.

Este tiempo comienza en el momento en que se alcanza la temperatura de esterilización dentro de la cámara. Además, se agrega un tiempo de seguridad o de sobre exposición que es igual a la mitad del tiempo empleado para el calentamiento más 2 minutos (de acuerdo a las normas DIN) y finalmente la fase de enfriamiento y secado, en la que se utiliza vacío para extraer el vapor de interior. El ciclo de esterilización más empleado en la industria farmacéutica y laboratorios es el vapor saturado a una temperatura de 121 °C durante no menos de 15 minutos de exposición. Esta temperatura se logra por vapor de agua a una atmósfera de sobre presión con respecto a la presión atmosférica (Autoclave Safety and Operation, 2015).

Otro método de esterilización es la filtración, es un método lento, caro y al que sólo se recurre cuando se trata de líquidos que por su composición no pueden someterse a calentamiento. Es una operación que permite separar sólidos de fluidos que los mantienen en suspensión, haciéndolos pasar a través de un medio poroso. Frecuentemente se fuerza el paso del líquido

a través del filtro, aplicando presión, vacío o centrifugación en grado no muy intenso. Para optimizar el proceso se utilizan varios pasos de filtración desde mayor a menor porosidad, siendo 0.2 micrometros el filtro adecuado en el punto final del proceso cuando se pretende esterilidad. Es necesario realizar esta metodología en un ambiente aséptico. Este procedimiento esteriliza basándose en dos principios fundamentales: La adsorción (fenómeno físico-químico de atracción de partículas de carga eléctrica distintas) y el tamiz (remoción de partículas sólidas a través de una sustancia porosa, teniendo en cuenta el tamaño de las partículas y el diámetro del poro). Las condiciones que deben reunir los filtros son: porosidad uniforme, retención de gérmenes con seguridad, soportar diferencias de presión para obtener un caudal eficaz y no sufrir alteraciones estructurales por acción de las soluciones, fácil de limpiar o de preferencia descartable, soportar esterilización por vapor a 121 °C, no ceder partículas extrañas al filtrado y no alterar la composición del líquido. Actualmente los filtros más utilizados son de Nylon 66, polipropileno, poliamida y fluoruro de polivinilideno (FEUM, 2008).

En fuentes naturales la presencia de compuestos bioactivos es un factor que puede ser alterado si se les someten a cambios de presión o temperatura afectando su composición y biofuncionalidad de de los compuestos bioactivos. Con respecto a la estabilidad térmica de algunos compuestos como las procianidinas, se han realizado estudios sobre extractos de té en los que las concentraciones de catequinas disminuyeron cuando las muestras son tratadas térmicamente a temperaturas que oscilan entre 70 y 120 °C. En estudios realizados específicamente en extractos de semilla de uva (Kim et al., 2007), se encontró que a temperaturas de 150 °C durante 40 min se genera un incrementó en el contenido de compuestos fenólicos hasta en un 50%, sin embargo, al elevar la la temperatura a 200 °C el contenido fenólico se redujo al igual que su actividad antioxidante.

Algunos otros estudios han reportado la epimerización de catequinas a altas temperaturas (Wang y Helliwell, 2000) o los cambios en proantocianidinas después del procesamiento térmico (You et al., 2006). Hay resultados controvertidos con respecto al efecto de los procesos térmicos sobre la actividad antioxidante (Larrauri et al., 1997; Kim et al., 2006). El tamaño de los compuestos, expresado como grado de polimerización, también es un factor importante que afecta la capacidad antioxidante (Saint et al., 1999). Numerosos alimentos y

materiales vegetal que contienen compuestos fenólicos están sujetos a procesos térmicos que influyen en los perfiles cualitativos y cuantitativos de sus compuestos fenólicos. Una cantidad sustancial de compuestos fenólicos presentes en las frutas y plantas, están en una forma que no está fácilmente disponible de reaccionar (Ross et al., 2011).

En este sentido los resultados reportados en la literatura son tan variados y dependen principalmente de la composición del material vegetal o fruto y condiciones como temperatura, tiempo de exposición, humedad, pH, el cambio en la conformación de compuestos con propiedades antioxidantes o generación de otros componentes por efecto del tratamiento con calor podría aumentar la cantidad de sustancias activas, mejorando sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

2.14 Objetivos

2.14.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la esterilización por filtración y tratamiento térmico de los extractos de los rizomas de la planta *Jatropha dioica* y del fruto *Opuntia oligacantha* en sus propiedades funcionales.

2.14.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de los rizomas de *Jatropha dioica* y del fruto entero de *Opuntia oligacantha* mediante maceración en etanol y extracción acuosa respectivamente.
- Esterilizar por filtración y tratamiento térmico a 121 °C, 15 psi, por 15 min los extractos de los rizomas de la planta *Jatropha dioica* y del fruto de *Opuntia oligacantha*.
- Evaluar el efecto de los métodos de esterilización de los extractos en sus propiedades fisicoquímicas.
- Evaluar el efecto de los métodos de esterilización de los extractos en sus propiedades antioxidantes.
- Identificar los compuestos presentes en los extractos esterilizados por filtración y tratamiento térmico en los extractos de los rizomas de la planta *Jatropha dioica* y del fruto de *Opuntia oligacantha* mediante la técnica de HPLC.
- Evaluar el efecto de los métodos de esterilización de los extractos en las propiedades antimicrobianas contra *S. mutans*.

III. JUSTIFICACIÓN

Los cambios en el estilo de vida han incrementado el riesgo de contraer enfermedades que parecieran no tener relevancia en el estado de salud, sin embargo, éstas se encuentran vinculadas con otros padecimientos en donde el riesgo es mayor. La caries es una enfermedad multifactorial aparentemente inofensiva que implica la interacción entre los dientes, la saliva, la microbiota oral, factores del huésped, dieta, higiene bucal y genética. La evolución de la caries trae consigo problemas como la gingivitis generando inflamación en encías siendo esta la primera señal de alerta de un incremento en la actividad de bacterias patógenas en la boca para finalmente desencadenar problemas más graves como la periodontitis que afectan a los tejidos que rodean y dan soporte a la cavidad de las piezas dentales. En México 9 de cada 10 personas padecen caries lo que ha incrementado la venta de productos dentífricos para prevenir y tratarla, sin embargo, los compuestos químicos empleados como los antisépticos generan efectos indeseables cuando su uso es prolongado, los efectos van desde la pigmentación de los dientes, irritación de mucosa, pérdida del gusto, hasta la generación de resistencia bacteriana hacia los compuestos antimicrobianos empleados en los productos de higiene bucal. Como alternativa a los compuestos químicos antisépticos se proponen los extractos naturales, que han demostrado en diversas investigaciones presentar actividad antimicrobiana contra patógenos de la cavidad bucal. Sin embargo, la presencia de la microbiota nativa de las fuentes naturales o adquiridas durante el proceso de la obtención de los extractos no asegura su empleo en la formulación de productos, por esa razón una opción es la esterilización mediante métodos térmicos, no obstante, se ha reportado disminución y en algunos casos incrementos en los compuestos bioactivos presentes de las materias primas o extractos naturales sometidos a diferentes procesos térmicos. En México existe una gran diversidad de frutos y plantas que presentan propiedades antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes y antiinflamatorias como lo es la planta sangre de drago y el fruto xoconostle, los cuales contienen compuestos bioactivos que pueden generar un área de oportunidad para su investigación y para el desarrollo de productos de higiene bucal capaces de prevenir o coadyuvar en los problemas de caries o gingivitis.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Rizomas de la planta sangre de drago (*Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. Var. *dioica*) se recolectaron en febrero de 2017 (período seco), en el Municipio de Morelos, Zacatecas, México, ubicado en las coordenadas 22°53'00" N y 102°36'00" O, a 2348 m sobre el nivel del mar (ms.n.m.), con clima seco y semiseco y tipo de suelo phaeozem. Los ejemplares fueron identificados y conservados en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con el código de registro "AD Hernández Fuentes 01". Los rizomas se almacenaron a baja temperatura (−70 °C) (Thermo Scientific 703 Ultra-Low Freezer, Grand Island, NY, USA), para posteriormente ser liofilizados (modelo 79480 LABCONCO, Kansas City, MO, USA) y almacenados a 5 °C durante una semana previo a su empleo.

Las muestras de los frutos de xoconostle (*Opuntia oligacantha* CF Först var. 'Ulapa') se tomaron en febrero de 2017 en Ulapa Melchor Ocampo Hidalgo, en el Municipio de Tetepango, Hidalgo, México, ubicado en las coordenadas 20°40'55' latitud N y 99°04'59" longitud oeste, a 2100 m.s.n.m, con clima templado semiseco y suelo aluvial. Los frutos de xoconostle fueron identificados por Hernández-Fuentes et al. (2015). Los frutos se seleccionaron en estado de madurez comercial (completamente coloreados), se lavaron y se eliminaron los glóquidos. Los frutos se almacenaron a temperaturas ultra bajas (−70 °C) (Thermo Scientific 703 Ultra-Low Freezer, Grand Island, NY, USA), para ser liofilizados (Modelo 79480 LABCONCO, Kansas City, MO, USA) y se almacenaron (5 °C durante una semana antes de su uso).

4.2 Procedimiento de extracción

Los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago se obtuvieron siguiendo la metodología sugerida por Wong-Paz et al. (2015), con ligeras modificaciones. Las modificaciones fueron en el secado de los rizomas, éstos se liofilizaron en lugar de hacer un secado a 60 °C. Las extracciones se realizaron utilizando etanol al 70% en una relación rizoma / disolvente de 1:5. La fracción líquida fue filtrada, utilizando papel whatman n° 5, posteriormente se recuperó el disolvente en un evaporador rotatorio (Büchi R-215, Flawil,

Suiza) a 50 °C en condiciones de vacío. El extracto recuperado del evaporador rotatorio se pesó y almacenó bajo condiciones de oscuridad, para su empleo se volvió a disolver con agua destilada a una concentración de 0.2 a 5 mg de extracto seco/mL en un baño ultrasónico (se emplearon diluciones para obtener valores de absorbancias en los métodos espectrofotométricos) (Ultrasonic Cleaner, Mod. 32V118A, Freeport, IL, USA) para su disolución completa bajo las condiciones de operación de 30 °C por 20 min.

Los extractos de xoconostle se obtuvieron utilizando el fruto entero liofilizado (cáscara, pulpa y semillas). La fruta liofilizada se trituró, se suspendió en agua destilada y se centrifugó (Thermo Scientific, Mod. ST 16R, Waltham, MA, USA.) a 17,500 g durante 10 min a 5 °C. Posteriormente se separó el sobrenadante y se repitió el procedimiento con el precipitado hasta que hubo una pérdida total de color en la fase líquida (entre 4 a 6 lavados). El sobrenadante se deshidrató por liofilización. Las muestras secas se molieron, se pesaron y se redisolieron con agua destilada, se emplearon concentraciones de 0.2 a 80 mg de extracto seco/mL, sonicándolas para su completa disolución de acuerdo a las propiedades evaluadas.

4.3 Esterilización de los extractos

Los análisis microbiológicos previos (pruebas de sensibilidad por el método de macrodilución en tubo y siembra en placa) de los extractos, mostraron la presencia de microorganismos, debido a una posible contaminación durante su extracción y la microbiota nativa en las materias primas. Por esta razón, los extractos se sometieron a un proceso de esterilización por autoclave y por filtración. Las condiciones de la esterilización en autoclave fueron de 121 °C durante 15 min a 15 psi (Tuttnaver, 354SE, Hauppauge, NY, USA). La esterilización por filtración se realizó a través de acrodiscos de 0.20 µm (filtro para jeringa). La nomenclatura utilizada para identificar a los extractos esterilizados por filtración de los rizomas de la planta sangre de drago y de la fruta xoconostle fueron SA y XA, respectivamente. Los extractos esterilizados en autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle fueron etiquetados como SB y XB.

4.4. Determinación de las propiedades fisicoquímicas

Se determinaron las propiedades físicoquímicas para los extractos esterilizados por filtración y esterilizados en autoclave. El pH se midió de acuerdo con el método AOAC 920.151 (2000), utilizando un potenciómetro digital (Hanna Instruments Woonsocket, RI, USA). El contenido total de azúcares se determinó por espectrofotometría, siguiendo el método descrito por Dimler et al. (1952) (ensayo antrona-H₂SO₄), las mediciones de las absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 640 nm (modelo 6715 UV / Vis, Jenway, Techne Inc., Staffordshire, Reino Unido). La concentración de azúcares reductores se determinó por espectrofotometría de acuerdo con el método sugerido por Miller (1959) empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 540 nm. La glucosa se empleó como estándar para las dos últimas determinaciones. El contenido de ácido ascórbico se determinó mediante espectrofotometría siguiendo la metodología desarrollada por Jagota y Dani (1982). Se utilizaron 0.1 mL del extracto, diluido en 10 mL de ácido tricloroacético (10% p/v) y se dejó reaccionar durante 10 minutos, posteriormente su absorbancia fue medida a una longitud de onda de 760 nm. Los atributos de color de los extractos (valores de L*, a* y b*) se midieron utilizando un colorímetro Hunter Lab (Minolta, CM508d, Minolta Camera Co., Ltd., Osaka, Japón), la diferencia total de color (ΔE) se obtuvo con la Ecuación (1):

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (1)$$

donde ΔL^* es la diferencia de luminosidad, Δa^* es la diferencia de rojo y Δb^* es la diferencia de amarillo registrada en los extractos que fueron esterilizados por filtración y por tratamiento térmico.

4.5 Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de compuestos fenólicos se determinó para los extractos esterilizados por filtración y esterilizados por autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto

xoconostle. El contenido fenólico total se estimó utilizando la metodología propuesta por Singleton y Rossi (1956). Se preparó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) utilizando 1 mL de reactivo en 9 mL de agua destilada, su preparación se realizó bajo condiciones de obscuridad, además se preparó una solución de carbonato de sodio al 7.5%. Los extractos se disolvieron en agua destilada (0.5 mL) se mezclaron con 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na_2CO_3 (0.7 N) y se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad durante 2 h. Las absorbancias se midieron a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (modelo 6715 UV/Vis, Jenway, Techne Inc., Staffordshire, Reino Unido) y las mediciones obtenidas se compararon con una curva estándar preparada con una solución de ácido gálico (0.01 a 0.006 mg/mL). El contenido fenólico total se expresó como miligramos de ácido gálico por gramos de extracto seco (mg de GAE/g).

4.6. Determinación del contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides se estimó de acuerdo con la metodología adaptada por Arvouet-Grand et al. (1994). Se utilizó una solución de tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 2 % con metanol puro. Se preparó una solución que contenía a los extractos disueltos en agua destilada (2 mL) y AlCl_3 dejándolos reposar por 20 minutos bajo condiciones de obscuridad. Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro. La concentración de flavonoides se calculó basándose en una curva de calibración empleando quercetina (Q) como estándar a concentraciones de 0.08 a 1 mg/mL y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg QE /g).

4.7. Cuantificación de betalaínas

Las betalaínas se cuantificaron exclusivamente para los extractos esterilizados por filtración y autoclave del fruto xoconostle (ya que la planta sangre de drago contiene antocianinas, excluyendo así la presencia de betalaínas), siguiendo la metodología sugerida por Nilsson (1970) para estimar la concentración de betaninas y vulgaxantinas. Los extractos de xoconostle se disolvieron en agua destilada. Las mediciones se registraron a 476, 538 y 600 nm utilizando un espectrofotómetro, donde A_{476} , A_{538} y A_{600} fueron los valores de

absorbancia obtenidos en estas longitudes de onda, respectivamente. Las betaninas y las vulgaxantinas se determinaron mediante las ecuaciones (2) y (3), modificadas de Nilsson. El contenido se expresó en mg /100 g de extracto seco (ES).

$$\text{betaninas} = \left[\left(\frac{a}{1.129} \right) (DF) (1 \times 10^5) \right] \quad (2)$$

$$\text{vulgaxanthinas} = \left[\left(\frac{y}{750} \right) (DF) (1 \times 10^5) \right] \quad (3)$$

Donde $a = 1.095 (A_{538} - A_{600})$; $y = A_{476} - (A_{538} - a) - (a / 3.1)$ y DF = factor de dilución.

4.8. Identificación de compuestos de extractos por HPLC

Los compuestos de los extractos esterilizados por filtración y autoclave se identificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo LC binario Agilent Technologies 1260 Infinity, con un detector de diodos (DAD) y una bomba binaria 1260 Infinity. Previo a su uso se realizó la limpieza de la aguja, en donde la fase móvil fluyó a través del dispositivo de medida del inyector automático, de este modo se garantizó que todas las piezas que entraran en contacto con la muestra inyectada se lavarán durante el análisis y se redujera el arrastre de contaminantes. Los extractos SA, SB, XA y XB se prepararon a una concentración de 5 mg/mL en agua destilada, se centrifugaron a 17,500 g durante 15 min y se filtraron en acrodiscos de tamaño de poro de 0.2 μm como preacondicionamiento de la muestra para retirar impurezas. El contenido de extracto y el tipo de metabolitos se identificaron siguiendo la metodología descrita por Aguiñiga-Sánchez et al. (2017). Los flavonoides se determinaron en una columna HP Hypersil ODS (125 \times 40 mm) en condiciones de un gradiente de (A) H_2O a pH 2.5 con ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) con los siguientes parámetros: el volumen de inyección fue 20 μL , la velocidad de flujo se fijó a 1 mL/min, la temperatura de reacción fue de 30 $^\circ\text{C}$ y el período de análisis fue de 25 min. Los estándares utilizados fueron: rutina, florizidina, mirecetina, quercetina, naringenina, fletina, apigenina y galangina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en un rango de concentraciones de 5-125 $\mu\text{g/mL}$. Para la determinación de los ácidos

fenólicos se utilizó una columna Nucleosil (125 × 4,0 mm, Macherey-Nagel) con un gradiente de (A) H₂O a pH 2.5 con TFA (ácido trifluoacético) y (B) ACN (acetonitrilo). Los parámetros experimentales fueron los mismos que para los flavonoides, mientras que los estándares empleados fueron: ácido cafeico, gálico, clorogénico, vanílico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico, ferúlico y siríngico (Sigma Aldrich) en un rango de concentraciones de 5-125 µg/mL.

4.9. Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

El método empleado se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización le otorga una coloración violeta, cuando la disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno con otra especie radical, produciéndose la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto una disminución de los valores de absorbancia. La actividad antioxidante se determinó para los extractos esterilizados por filtración y por autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago y el fruto xoconostle. El método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) sugerido por Brand-Williams et al. (1995), fue empleado para las estimaciones. Se emplearon 2.4 mg de DPPH en 100 mL de metanol, dejando la mezcla en agitación por 2 h bajo condiciones de obscuridad. Posteriormente la solución de DPPH se ajustó a valores de absorbancia de 0.7 ± 0.01 adicionando metanol, ajustada la solución se usó un total de 300 µL de cada extracto preparado en agua destilada con 2.7 mL de solución de DPPH y se mantuvo bajo condiciones de oscuridad durante 60 min. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro y la actividad antioxidante se expresó como mg equivalentes de trolox por gramo de muestra seca (mg TE/g).

4.10 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

El método 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se llevó a cabo de acuerdo con Re et al. (1999). El reactivo ABTS se disolvió en agua destilada a concentración de 7 mM, el catión radical ABTS^{•+} se produjo por la reacción de la solución madre de ABTS

con una solución de persulfato de potasio al 2.45 mM en una proporción de 1:1. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente (25 °C) por 24 h bajo condiciones de obscuridad previo a su empleo. La solución radical ABTS fue ajustada con metanol puro a valores de absorbancia de 0.7 ± 0.1 , posteriormente se utilizó un total de 100 μ L de cada extracto preparados con agua destilada y mezclados con 3.9 mL de solución ABTS (previamente preparada con $K_2S_2O_8$). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 754 nm. Se realizó una curva estándar de calibración empleando Trolox y los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca (mg TE/g).

4.11 Actividad antimicrobiana

Las actividades antimicrobianas de los extractos esterilizados por filtración y autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle se determinaron de acuerdo a la metodología desarrollada por Domínguez et al. (2011). Se preparó una mezcla mediante la combinación de 10 mL de caldo de infusión cerebro corazón (BHI), 5 mg/mL de extracto esterilizado por filtración y por autoclave y 100 μ L de medio líquido que contenía *Streptococcus mutans* (ATCC 25175, número de lote: 62284317) a una concentración final de 103 UFC/mL. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 80 h. Los cambios en la turbidez se midieron cada 4 h en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, utilizando una celda de cuarzo (1000 μ L). Cada extracto se evaluó frente a blanco que contenía caldo BHI y el extracto sin *Streptococcus mutans*, un control positivo que contenía 10 mL de caldo BHI y 103 UFC/mL de *S. mutans* y un control negativo que contenía 10 mL de caldo BHI, 103 UFC/mL de *S. mutans*, y 0.012 μ L de clorhexidina/mL (GUM Paroex, Sunstar Suisse SA, Étoy, Suiza). La concentración de clorhexidina se estableció de acuerdo con la investigación desarrollada por Aguilera et al. (2011). Los resultados se expresaron en log UFC/mL. Se evaluó el efecto de los extractos sobre la tasa de crecimiento (μ) de *S. mutans*. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se definió como la concentración de extracto más baja a la que las bacterias inoculadas no mostraron un crecimiento visible. Se utilizó el método de macrodilución en caldo BHI acoplado a un método espectrofotométrico ligeramente modificado (Salmon et al., 1998) para determinar

la CMI. En este experimento, se usó una cepa de *S. mutans* (a una concentración de 10^3 UFC/mL), así como dos controles: negativo (la cepa de *S. mutans* y clorhexidina) y positivo (que contiene solo la cepa de *S. mutans*). La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 600 nm a las 96 h. Los controles se prepararon con caldo BHI y cada extracto. El criterio de crecimiento fue la turbidez definida y medida con el método espectrofotométrico. La ausencia o presencia del *S. mutans* en las diferentes concentraciones de los extractos evaluados se corroboró, tomando una muestra de cada tubo, inoculándola en placas de agar BHI por el método de siembra en estría y verificando las ccas morfológicas de las cepas.

4.12 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron los promedios. Se realizó un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado, en el que se evaluaron los efectos de la esterilización mediante autoclave en las variables de respuesta: fenoles totales, flavonoides, betalaínas, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*. El ordenamiento de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). El análisis se llevó a cabo en el paquete estadístico SAS versión 9.4.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Análisis fisicoquímicos

Los resultados obtenidos en los rendimientos de extracción para el extracto seco de los rizomas de la planta sangre de drago fueron de 5.5 g/100 g de rizoma y de 31.26 g de extracto seco de xoconostle por cada 100 gramos de fruto liofilizado. Por otra parte los resultados obtenidos al comparar los métodos de esterilización (autoclavevs filtracion) se observó un cambio en los valores de las propiedades fisicoquímicas y del contenido de los compuestos bioactivos para ambos extractos, los resultados en las variaciones se discuten en los siguientes apartados y son dependientes de la composición de las materias primas empleadas, puesto que en algunos compuestos, los valores disminuyeron y en otros incrementaron lo cual podría resultar beneficioso en las propiedades finales de los extractos. En la Tabla 3 se muestran los parámetros fisicoquímicos de los extractos obtenidos para las fuentes naturales utilizadas. La esterilización por autoclave de los extractos causó un aumento en el pH, el valor de SB fue 16.9% más alto que los valores de SA, mientras que XB presentó un aumento de 21.87% con respecto a XA. Esto se relacionó con la reducción de ácidos orgánicos, durante el tratamiento térmico debido al carácter termolábil de las moléculas presentes como el ácido ascórbico, lo que podría explicar el aumento del pH en las muestras esterilizadas por tratamiento térmico (Cuastumal-Canacuan et al., 2016). El contenido de azúcares totales durante el proceso de esterilización en la muestra SB no presentó diferencias estadísticas respecto a SA, así como el contenido de azúcares reductores. Mientras tanto, en las muestras de XB, el contenido de azúcares totales aumentó un 13.0% y los azúcares reductores un 10.98%. Su aumento puede deberse a procesos de hidrólisis térmica debido al calentamiento durante la esterilización en autoclave, generando una ruptura en los enlaces de los compuestos glicosilados y aumentando la concentración de las concentraciones de azúcares simples (Pokorný, 2003).

Tabla 3. Análisis fisicoquímicos de los extractos de rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle esterilizado por filtración y en autoclave.

Muestra	pH	CTA (mg GluE/g PS)	AR (mg GluE/g PS)	Ácido ascórbico (mg ASCE/ 100g PS)
SA	5.60±0.17b	158.20±6.40c	87.10±1.28c	267.30±30.07b
SB	6.55±0.50a	179.44±7.02c	116.01±6.40c	99.53±24.73c
XA	3.20±0.35d	503.00 ±26.19b	466.60±16.81b	443.70±20.84a
XB	3.90±0.25c	568.46 ±19.20a	517.84±9.30a	280.02±16.18b

a,b,c: letras distintas en las columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) El pH se midió a concentraciones de extracto de 10 mg/mL a 25.5 °C; CTA: contenido total de azúcar; AR: azúcares reductores; ASC: ácido ascórbico; SA: extracto de rizoma de la planta sangre de drago esterilizado por filtración; SB: extracto de rizoma de la planta sangre de drago esterilizado en autoclave; XA: extracto del fruto xoconostle esterilizado por filtración; XB: extracto del fruto xoconostle esterilizado en autoclave; GluE: equivalentes de glucosa; PS: peso seco de la muestra; ASCE: equivalentes de ácido ascórbico.

Respecto a los parámetros de color (tabla 4), los extractos esterilizados por autoclave de la planta sangre de drago se tornaron más oscuros (tono ámbar) respecto a los esterilizados por filtración, debido a la reducción de la luminosidad y al aumento de los valores de b^* , que tendía al color amarillo. El cambio de color en los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago podría vincularse a las reacciones de caramelización o de Maillard, debido a la presencia de azúcares y las condiciones de temperatura elevada durante el proceso de esterilización en autoclave (Yin et al., 2018). Los extractos del fruto xoconostle esterilizados por filtración tenían una coloración rojiza (valores de a^* mayores y valores menores de luminosidad), en comparación con los extractos esterilizados. En este último caso, esto puede deberse a la pérdida de betalaínas que son responsables de atribuir una coloración roja a los frutos de xoconostle, como también ocurre en otros frutos de cactáceas (Hernández-Fuentes et al., 2015; López-Palestina et al., 2018).

Tabla 4. Cambios en el color de los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle esterilizado por filtración y autoclave.

Extractos	CIELAB espacio de color			
	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	ΔE
SA	35.39 ± 0.48a	11.12 ± 0.12c	43.23±0.51b	10.24±0.43b
SB	29.88 ± 0.25b	14.88 ± 0.72b	47.49±0.71a	
XA	24.38 ± 0.52c	32.91 ± 0.25a	25.32±0.48b	33.06±1.76a
XB	34.83 ± 0.38a	11.33 ± 0.40c	49.78±0.99a	

a,b,c: letras distintas en las columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$); SA: extracto de rizomas de la planta sangre de drago esterilizado por filtración; SB: extracto de rizomas de la planta sangre de drago esterilizado en autoclave; XA: extracto del fruto xoconostle esterilizado por filtración; XB: extracto del fruto xoconostle esterilizado en autoclave; *L**: luminosidad; *a**: componente de color verde a rojo; *b**: componente de color azul a amarillo; ΔE : diferencia de color total entre extractos esterilizados por filtración y autoclave.

5.2 Determinación de fenólicos totales y los flavonoides

El proceso de esterilización en autoclave afectó de manera importante y significativa a la concentración de compuestos fenólicos en los extractos de la planta sangre de drago, pero no en los extractos del fruto xoconostle (tabla 5). Se observó que las concentraciones de fenoles totales y de flavonoides en SB aumentaron en un 95.7% y en un 92% respectivamente, casi el doble de la cantidad respecto a los extractos esterilizados por filtración. Randhir y et al. (2008) mencionan que el tratamiento térmico promueve la liberación de compuestos fenólicos, debido a la descomposición de las paredes de la célula y de los componentes celulares como las vacuolas, también mencionan que el tratamiento térmico disocia los polifenoles conjugados, como los taninos, a compuestos fenólicos más simples. En algunos estudios en los que se utilizó el tratamiento térmico con autoclave, las muestras de brotes de grano, plántulas y leguminosas también presentaron un aumento en el contenido fenólico total (Beta y Hwang, 2018). Los contenidos fenólicos en los extractos pueden verse afectados por factores extrínsecos como la temperatura, el pH, la luz y el contenido de oxígeno, entre otros (Felix et al., 2018). En la presente investigación, el baño de ultrasonido que se utilizó para la rehidratación de los extractos también puede haber tenido un efecto en el aumento del contenido total de fenoles en los extractos de rizoma de la planta sangre de drago, esto se debe a que el tratamiento con ultrasonido provoca microroturas en las partículas suspendidas

mediante el fenómeno de cavitación, lo que aumenta el área de la superficie y mejora la solubilización de los compuestos fenólicos (Altemimi et al., 2015).

Tabla 5. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante en extractos de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle esterilizados por filtración y autoclave.

Muestra	CFT (mg EAG/g)	Flavonoides (m EQ/g)	Betalaínas totales		Actividad antioxidante	
			CB (mg/100g)	CVX (mg/100g)	DPPH (mg ET/g)	ABTS (mg ET/g)
SA	99.25±2.50b	23.59±0.5b	ND	ND	273.69±2.93a	310.68±6.81b
SB	194.31±7.04a	45.30±0.24a	ND	ND	269.38±2.71b	345.02±10.57a
XA	24.11±1.21c	13.62±0.66d	28.64±0.96a	11.92±0.13b	42.87±0.96b	26.72±1.21c
XB	23.53±0.23c	15.92±0.24c	4.24±0.09b	14.67±0.40a	31.81±0.96c	21.83±1.49c

a,b,c: letras distintas en las columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$); CTF: compuestos fenólicos totales; CB: contenido de betanina; CVX: contenido de vulgaxantina; SA: extracto de rizoma de la planta sangre de drago esterilizado por filtración; SB: extracto de rizoma de la planta sangre de drago esterilizado en autoclave; XA: extracto del fruto xoconostle esterilizado por filtración; XB: extracto del fruto xoconostle esterilizado en autoclave; EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina; ND: No detectado; ET: equivalentes de trolox; todos los valores se determinaron según el peso seco de la muestra (PS).

Los extractos esterilizados por filtración de sangre de drago mostraron un contenido de compuestos fenólicos de 75% más altos que los extractos esterilizados por filtración de xoconostle, mientras que los extractos esterilizados por autoclave de sangre de drago tuvieron un contenido fenólico de 87.7% más alto que los extractos de xoconostle esterilizados en autoclave. Esto puede deberse al hecho de que, en la planta de sangre del drago, las raíces son los primeros tejidos que detectan una condición de déficit de agua e inducen señales de estrés, que se traducen en una mayor concentración de metabolitos secundarios en los que se incluyen los compuestos fenólicos (Gutiérrez-Tlahque et al., 2018). Otra razón podría deberse a la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático), la caramelización y la oxidación química de los fenoles, ya que los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago cambian su color a ámbar (tabla 4) cuando se someten a esterilización en autoclave (Randhir et al., 2008; Eichner, 1981). Martínez et al. (2014) reportaron la presencia de aminoácidos libres y aminos en las muestras de rizomas de la planta sangre de drago sometidas a condiciones térmicas; estos compuestos reaccionan con los azúcares reductores,

produciendo otros de propiedades quelantes y reductoras (Manzocco et al., 2011). Todo lo anterior podría tener un efecto en el aumento de la cuantificación de fenoles totales en SA.

Por otro lado, algunos flavonoides son estables a altas temperaturas. Elhamirad y Zamanipoor (2012) reportaron que cuando la temperatura aumenta, se genera el proceso de hidrólisis térmica de los compuestos glicosilados, incrementando la solubilidad y modificando el coeficiente de difusión de los compuestos presentes, lo que podría causar el aumento en el contenido de flavonoides en los extractos SB y XB.

5.3 Determinación de betalainas en extractos de xoconostle

No se realizó la medición del contenido de betalainas en los extractos del rizoma de la planta sangre de drago, debido a su ausencia en esta especie (Martínez et al., 2014). Por esta razón, el contenido de betalaína solo se tomó en extractos del fruto xoconostle, donde se observó una disminución de 85.19% en el contenido de éstas en los extractos XB respecto a los extractos XA (tabla 5), mientras que el contenido de vulgaxantinas fue 23% mayor en los extractos de XB en comparación con los extractos de XA. La pérdida del color típico en los extractos del fruto xoconostle sometidos a altas temperaturas se relacionó con una disminución en los contenidos de betaninas e isobetanina (estos compuestos otorgan la coloración roja y naranja en el fruto xoconostle). Esta reducción se debe a una reacción de deshidrogenación en betaninas e isobetaninas durante los tratamientos térmicos, formando compuestos tales como las neobetaninas (Herbach et al., 2006). Las neobetaninas presentan una coloración amarilla, estos compuestos presentan absorbancias a longitudes de onda similares a las vulgaxantinas; por lo tanto, su presencia podría estar relacionada con el aumento observado en el contenido de vulgaxantinas (Stintzing et al., 2005).

5.4 Identificación de compuestos extraídos por HPLC

Algunos ácidos fenólicos y flavonoides fueron detectados y confirmados por HPLC en los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle. En los extractos SB, se detectó un aumento de compuestos fenólicos respecto a los extractos de SA; este resultado tiene un comportamiento similar al encontrado en la cuantificación del contenido total de fenoles por el método espectrofotométrico, en donde en el proceso de esterilización por autoclave aumentó el contenido de los compuestos fenólicos. En la tabla 6 se muestran el contenido de ácido fenólico para los extractos evaluados, en donde se encontraron únicamente ácido vanílico y ácido cafeico para los extractos SA y SB y su contenido sufrió un incremento cuando se esterilizaron por autoclave. Por otra parte, en los extractos XA y XB se encontraron presentes el ácido gálico, ácido vanílico y ácido p-cumárico, viéndose reducida su concentración en los extractos esterilizados por autoclave. En la tabla 7 se muestra el contenido de flavonoides para los extractos SA y SB determinados por HPLC encontrando la presencia de naringenina, apigenina y galangina, además se observó un incremento en los extractos esterilizados por autoclave, mientras que para los extractos XA y XB únicamente se encontró presente a la galangina, sufriendo un incremento en los extractos sometidos a esterilización por autoclave.

Tabla 6. Contenido de ácidos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) en extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle detectados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Estándares de ácidos fenólicos								
Muestras	AG	ACG	AS	AV	APH	AC	AF	APC
SA	ND	ND	ND	1.98 \pm 0.02b	ND	0.08 \pm 0.01b	ND	ND
SB	ND	ND	ND	3.42 \pm 0.13a	ND	0.22 \pm 0.04a	ND	ND
XA	1.53 \pm 0.06 ^a	ND	ND	1.63 \pm 0.02c	ND	ND	ND	15.52 \pm 0.32a
	a							
XB	1.42 \pm 0.04b	ND	ND	1.24 \pm 0.08d	ND	ND	ND	14.41 \pm 0.21b
PR	2.5	4.29	5.1	5.5	5.71	6.63	9.36	9.74

a,b,c: letras distintas en las columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$); SA: extracto de los rizomas de la planta sangre de drago esterilizado por filtración; SB: extracto de los rizomas de la planta sangre de drago esterilizado en autoclave; XA: extracto del fruto xoconostle esterilizado por filtración; XB: extracto del fruto xoconostle esterilizado en autoclave; PR: período de retención; AG: ácido gálico; ACG: ácido clorogénico; AS: ácido sirínico; AV: ácido vanílico; APH: ácido p-hidroxibenzoico. AC: ácido cafeico; AF: ácido ferulico; APC: ácido p-cumárico.

Tabla 7. Contenido de Flavonoides ($\mu\text{g/mL}$) en extractos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle detectados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Estándares de flavonoides								
Muestras	RT	FN	MC	QE	NG	FT	AP	GLG
SA	ND	ND	ND	ND	25.45 \pm 1.05b	ND	0.96 \pm 0.003b	5.83 \pm 1.09b
SB	ND	ND	ND	ND	30.66 \pm 2.96a	ND	1.31 \pm 0.08a	8.69 \pm 1.72a
XA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.91 \pm 0.05d
XB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.58 \pm 0.25c
PR	4.4	6.77	7.57	10.5	12.25	13.18	14.63	22.0

a,b,c: letras distintas en las columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$); SA: extracto de los rizomas de la planta sangre de drago esterilizado por filtración; SB: extracto de los rizomas de la planta sangre de drago esterilizado en autoclave; XA: extracto del fruto xoconostle esterilizado por filtración; XB: extracto del fruto xoconostle esterilizado en autoclave; PR: período de retención; RT: rutina; FN: florizidina; MC: miricetina; QE: quercetina; NG: naringenina; FT: florentina; AP: apigenina; GLG: galangina; ND: No detectado.

El comportamiento observado en ambos extractos sometidos a esterilización por filtrado y por autoclave ha sido reportado en distintos trabajos de investigación en donde se enfatiza que la composición o matriz estructural de las materias primas empleadas en la obtención de extractos naturales cuando se someten bajo la acción de tratamientos térmicos, puede causar una reducción o incremento en el contenido de los compuestos polifenólicos, induciendo una mayor liberación a través de reacciones de hidrólisis pudiendo generar monómeros y dímeros. Wang y Helliwell (2000), mostrarón el efecto del calor y del oxígeno sobre la liberación de compuestos fenólicos en muestras de té verde.

También existen trabajos de investigación que señalan la disminución de los componentes fenólicos sensibles a las altas temperaturas (termolábiles) (Chamorro et al., 2012). En relación a lo antes mencionado Wong-Paz et al. (2015) realizaron un estudio sobre la cuantificación y determinación química de polifenoles mediante HPLC en extractos etanólicos-acuosos de los rizomas de la planta sangre de drago; en su estudio, concluyen que los compuestos fenólicos no fueron detectados debido a sus bajas concentraciones.

La presencia de los fenoles y flavonoides encontrados en los extractos evaluados, así como su incremento después de ser sometidos a esterilización por autoclave, podría contribuir en la mejora de las propiedades antimicrobianas, en este sentido algunos autores sugieren que la presencia de compuestos tales como los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico inhiben el crecimiento de los microorganismos gram negativos y gram positivos como *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* (Rodríguez-Sauceda y Ximhai, 2011).

5.5 Actividad antioxidante por DPPH y ABTS

Los beneficios potenciales que los compuestos fenólicos tienen para la salud se atribuyen principalmente a sus actividades antioxidantes al donar un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático a los radicales libres (López-Palestina et al., 2018). En la presente investigación, la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos de los rizomas de la planta sangre de drago y del fruto xoconostle se determinó a través de los ensayos de DPPH y ABTS, ambos presentan excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también

muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que se puede obtener directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica, con el ABTS se pueden medir compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (no son pruebas equivalentes si no complementarias). En la tabla 5 se muestra el efecto de la esterilización por filtración y por autoclave en la actividad antioxidante. La actividad antioxidante, de acuerdo al método DPPH, fue mayor en los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago respecto a los extractos del fruto xoconostle (tabla 5). Los extractos de SA, presentaron valores más elevados respecto a los extractos de SB, a pesar del incremento en el contenido de compuestos fenólicos en las muestras de SB. Por otra parte, en la prueba de ABTS se observó un incremento en los valores de la actividad antioxidante de los extractos SB respecto a los extractos SA. El incremento de los compuestos fenólicos debería incrementar la actividad antioxidante evaluada por el método de DPPH sin embargo el comportamiento obtenido podría deberse a que la reacción de estabilización de los componentes con actividad antioxidante presentes fue menor, posterior al tratamiento por autoclave. Diversos factores como la generación de posibles compuestos, el impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, así como la posible desaparición de sustancias termolábiles cuyo espectro de absorción se solapa con el radical, pueden ocasionar la disminución de los valores obtenidos. (Cuastumal-Canacuan et al., 2016; Shaimaa et al., 2016; Gonzáles-Cruz et al., 2018; Pastene, 2009). Por otro lado, algunos estudios indican que los mecanismos de reacción del antioxidante y el DPPH dependen de la conformación estructural de los mismos (Bondet et al., 1997; Pokorný, 2003).

Los resultados obtenidos por el método de ABTS indicaron un ligero incremento en la actividad antioxidante de los extractos SB del 11% sobre los extractos SA (tabla 3). Este comportamiento podría asociarse con un aumento en el contenido de fenoles y flavonoides, así como con algunos compuestos derivados de las reacciones correspondientes al cambio de color (reacciones de caramelización y de Maillard) con la capacidad de quelar metales y proporcionar actividad antioxidante (Yu et al., 2012). Para el método ABTS los interferentes podrían ser menores ya que dentro de las ventajas que presenta son un amplio rango de pH,

fuerza iónica, así como su solubilidad en medios acuosos y orgánicos permitiendo la evaluación de antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos.

Para los extractos del xoconostle se observó una disminución de los valores obtenidos en los métodos de DPPH y ABTS en los extractos esterilizados por autoclave, ésto podría estar relacionado con la disminución en el contenido de compuestos como las betaninas, causado por el efecto térmico (tabla 3). Otros compuestos termolábiles con propiedades antioxidantes, como el ácido ascórbico, pueden verse afectados durante la esterilización mediante autoclave, lo que influye en la actividad final de los extractos (Cuastumal-Canacuan et al., 2016; Pérez-Grijalva et al., 2018).

La diferencia entre los resultados observados por el método ABTS con respecto al de DPPH podría deberse a la diferencia entre los compuestos medidos por ambas técnicas; los resultados no pueden ser tomados como concluyentes pese a que la composición de ambas materias primas es distinta además de ser compleja y los posibles cambios o modificaciones posteriores a la esterilización por autoclave para ambos, puede generar distintos resultados los cuales pueden impactan en la actividad global final evaluada (Kuskoski et al., 2005).

5.6 Actividad antimicrobiana

Con respecto a la cinética de crecimiento de *Streptococcus mutans* en los extractos XA y SA (concentraciones de 5 mg/mL para ambos), no se observó crecimiento de la bacteria en SA (figura 2), obteniendo un resultado similar con el control negativo (clorhexidina). Algunos estudios afirman que el contenido de flavonoides, taninos y fenoles condensados de alto peso molecular en los rizomas de la planta sangre de drago son los responsables de las propiedades antimicrobianas que se encuentran en los extractos (Wong-Paz et al., 2010; Hu et al., 2016). Silva-Belmares et al (2014) sugieren que la actividad antimicrobiana de los extractos de los rizomas en la planta sangre de drago se debe a la presencia de terpenos como el β -sitosterol y citlalitrión. Los resultados observados para el control negativo (clorhexidina) se deben principalmente a su naturaleza catiónica, que permite su adherencia a la pared celular bacteriana; a bajas concentraciones, aumenta la permeabilidad, filtra los componentes

intracelulares, teniendo un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones precipita el citoplasma bacteriano y causa la muerte celular, efecto bactericida (Bascones-Martínez y Mudarra-Morante, 2006).

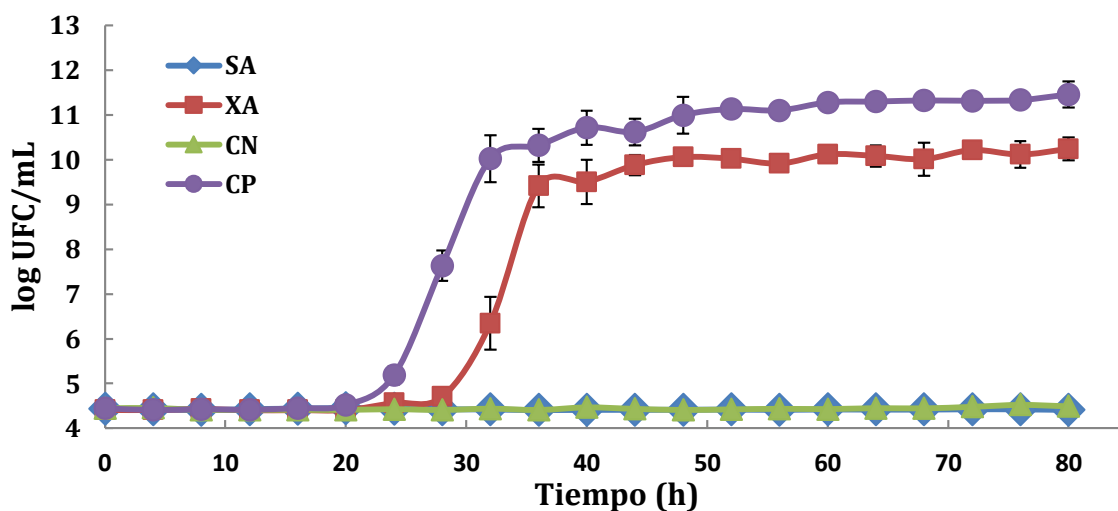


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Streptococcus mutans* de extractos: (♦) extracto de los rizomas de la planta sangre de drago (5 mg/mL); (■) Extracto del fruto xoconostle (5 mg/mL); (▲) control negativo (clorhexidina); (●) Control positivo; SA: extracto esterilizado por filtración de los rizomas de la planta sangre de drago; XA: extracto esterilizado por filtración del fruto xoconostle; CN: control negativo; CP: control positivo.

En las figuras 2 y 3 es posible observar el comportamiento del control negativo, correspondiente a la cepa *S. mutans*, observando un crecimiento exponencial después de la hora 20 (fase de adaptación, Lag); el valor de la tasa de crecimiento (en la fase logarítmica) del control negativo fue de $\mu=0.487 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.976$). En la figura 2 se muestra el comportamiento del extracto del fruto xoconostle esterilizado por filtración (5 mg/mL) en donde se observa que solo retrasó el crecimiento de *S. mutans* hasta 4 h respecto al control positivo durante la fase de adaptación (Lag), con una tasa de crecimiento en la fase logarítmica de $\mu=0.588 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.970$). Las propiedades antimicrobianas de los extractos de xoconostle fueron reportadas por Hayek e Ibrahim (2012), sin embargo, la concentración a la que los extractos del fruto xoconostle reportaron similar actividad respecto al control negativo (clorhexidina) fue de 28 a 80 mg/mL, que es relativamente alta en comparación con los compuestos antisépticos que se encuentran en los enjuagues bucales comerciales,

considerando que las concentraciones de los compuestos activos en estos productos comerciales oscilan entre 1 y 2 mg/mL (Yu et al., 2012).

La cinética de crecimiento de *S. mutans* en SB y XB se muestra en la figura 3. El comportamiento de los extractos de SB es similar al observado en los extractos SA (figura 2) mostrando que la temperatura durante la esterilización por autoclave no afectó la actividad del extracto de los rizomas de la planta sangre de drago. Por otra parte, el comportamiento de los extractos XB (figura 3) fue distinto cuando se comparó con los extractos XA (figura 2) obteniendo crecimiento de la bacteria con un retraso de 12 h en los extractos XB en comparación con los extractos XA durante la fase de adaptación (lag), con una tasa de crecimiento en la fase logarítmica en los extractos XB de $\mu = 0.289 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.991$) menor a la obtenido en los extractos XA. Por lo tanto, las propiedades antimicrobianas de los extractos esterilizados por autoclave del fruto xoconostle, retrasaron el crecimiento de *S. mutans* en la fase logarítmica, disminuyendo los valores del crecimiento (μ), a pesar de que no mostraron actividad bactericida a concentraciones de 5 mg/mL si presentó actividad bacteriostática.

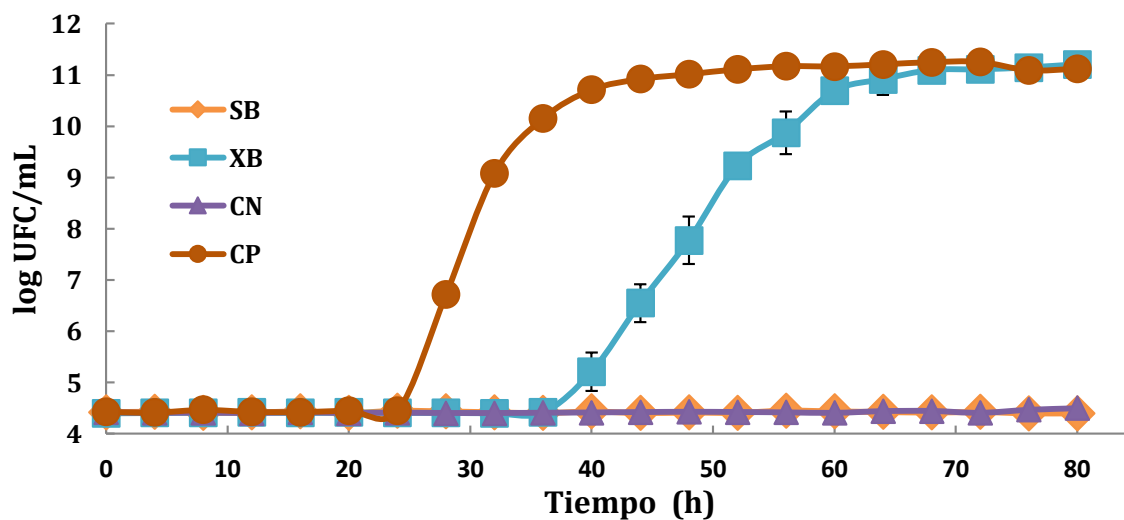


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Streptococcus mutans* de extractos: (♦) extracto de los rizomas de la planta sangre de drago (5 mg/mL); (■) Extracto del fruto xoconostle (5 mg/mL); (▲) control negativo (clorhexidina); (●) Control positivo; SB: extracto esterilizado por autoclave de los rizomas de la planta sangre de drago; XB: extracto esterilizado por autoclave del fruto xoconostle; CN: control negativo; CP: control positivo.

Después de realizar las comparaciones de las cinéticas de crecimiento entre los extractos esterilizados por filtración y por autoclave, se procedió a determinar la CMI exclusivamente en los extractos esterilizados en autoclave (las propiedades antioxidantes no variaron, la actividad antimicrobiana contra *S. mutans* se mantuvo y la microbiota nativa o por contaminación durante su extracción fue eliminada). Aunque la filtración de los extractos a través de los filtros de 20 μm es suficiente para eliminar los microorganismos, la esterilización mediante tratamientos térmicos suele ser más fácil de realizar, además garantizaría aplicación industrial de los extractos como agentes antimicrobianos. El valor de CMI para SB contra *S. mutans* fue de 2 mg/mL (figura 4), mientras que para XB, el valor de CMI fue de 28mg/mL (figura 5).

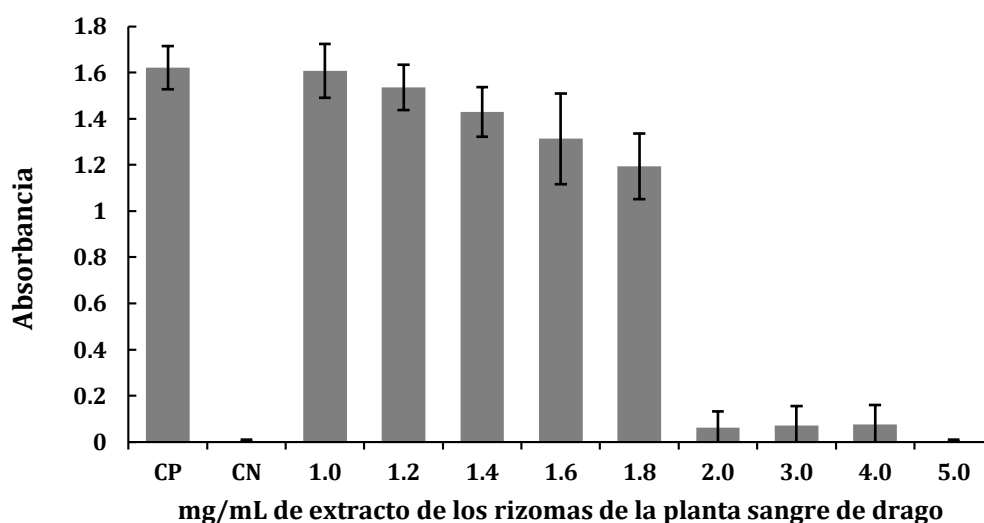


Figura. 4 Densidad óptica de *S. mutans* a diferentes concentraciones del extracto de los rizomas de sangre de drago esterilizados por autoclave con un tiempo de inoculación de 96 horas; CN: control negativo (Clorhexidina); CP: control positivo (*S. mutans*).

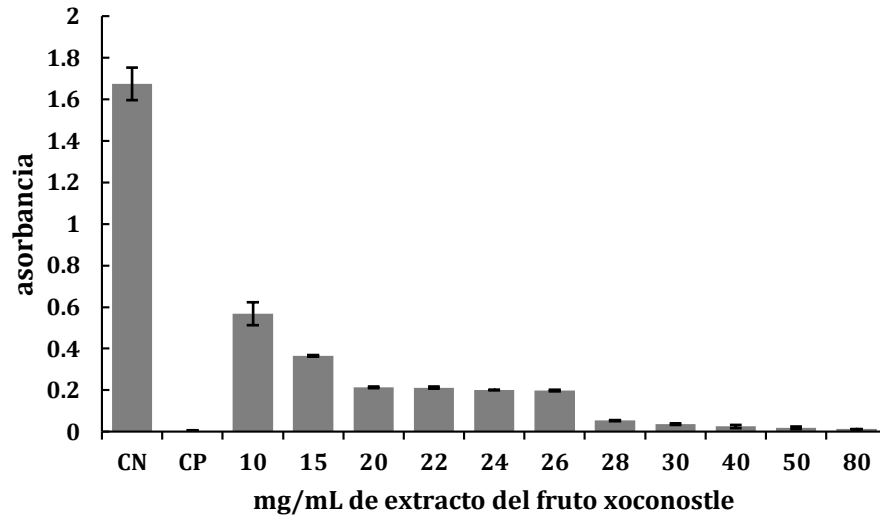


Figura 5. Densidad optica de *S. mutans* a diferentes concentraciones del extracto de xoconostle esterilizados por autoclave a las 96 horas de inoculación; CN: control negativo (Clorhexidina); CP: control positivo (*S. mutans*).

El extracto de los rizomas de la planta sangre de drago esterilizado en autoclave mostró actividad antimicrobiana a menor concentración (92% menor) en comparación con el extracto del fruto xoconostle; En la literatura, existen muy pocos estudios sobre las propiedades antimicrobianas de los extractos evaluados en el presente trabajo, contra cepas patógenas de la cavidad oral

VI Conclusiones

El extracto del fruto xoconostle representa una excelente opción comparado con el extracto de los rizomas de la planta sangre de drago debido a su rendimiento, sin embargo, los extractos que mostraron tener un mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante fueron los extractos de los rizomas de la planta sangre de drago.

El método de esterilización por tratamiento térmico generó modificaciones sobre las propiedades fisicoquímicas respecto a la esterilización por filtración, los valores de pH incrementaron, el contenido de azúcares reductores y totales aumentaron, mientras que el contenido de ácido ascórbico disminuyó, además de un cambio en la coloración de extracto el cual podría estar involucrado con las reacciones de caramelización y Maillard.

Respecto a las propiedades antioxidantes el tratamiento térmico provocó un aumento de los valores de ABTS mientras que los valores de DDPH disminuyeron lo que podría aseverarse que el tratamiento térmico originó un ligero incremento en los valores de actividad antioxidante.

Los extractos del fruto xoconostle esterilizados con el tratamiento térmico generó un incremento de los parámetros fisicoquímicos en el pH, en los azúcares totales y reductores y disminuyó el contenido de ácido ascórbico, mientras que en los valores de las propiedades antioxidantes se redujeron debido principalmente a la destrucción de compuestos termolábiles como las betalaínas, componente funcional mayoritaria.

El análisis de HPLC reveló que los compuestos mayormente relacionados con las propiedades antioxidantes fueron ácido vanílico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, naringenina, apigenina y galangina en los extractos de sangre de drago y ácido gálico, ácido vanílico, ácido p-cumárico y galangina en los extractos del fruto xoconostle, cuya concentración se vio afectada por el tratamiento térmico lo que explicaría el aumento en la capacidad antioxidante. Los compuestos detectados son los responsables de la actividad antimicrobiana observada en sangre de drago frente a *S. mutans*, mientras que, en los extractos de xoconostle al estar en menor cantidad, solo se observó un efecto bacteriostático limitado.

Finalmente, con los resultados obtenidos se concluye que el tratamiento térmico de los extractos representa una excelente opción que mantiene las propiedades antimicrobianas, además de ser de bajo costo frente a la esterilización por filtración. sin embargo, es necesario realizar mayor investigación con otras cepas patógenas y no patógenas de la microbiota oral para determinar el rango de acción y selectividad del efecto antimicrobiano. Así mismo, sería necesario realizar un enjuague que contenga el extracto para corroborar el efecto observado en las pruebas realizadas en el presente estudio mediante ensayos clínicos

VII Referencias

1. Aguilera, M. C.; Romano, E.; Ramos, N.; Rojas, L. Sensibilidad del *Streptococcus mutans* a tres enjuagues bucales comerciales (Estudio in vitro). *ODOUS Cient.* 2011, 12, 7–13. 28.
2. Aguiñiga-Sánchez, I.; Cadena-Iñiguez, J.; Santiago-Osorio, E.; Gómez-García, G.; Mendoza-Núñez, V. M.; Rosado-Pérez, J.; Ruíz-Ramos, M.; Cisneros-Solano, V. M.; Ledesma-Martínez, E.; Delgado-Bordanave, A. D. J.; et al. Chemical analyses and in vitro and in vivo toxicity of fruit methanol extract of *Sechiumedule* var. *Pharm. Biol.* 2017, 55, 1638–1645.
3. Altemimi, A.; Choudhary, R.; Watson, D. G.; Lighfoot, D. A. Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrason. Sonochem.* 2015, 24, 247–272.
4. Alves, A. C.; Nogueira, R. D.; Stipp, R. N.; Pampolini, F.; Morales, A. B., Goncalves, R. B. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *Journal of medical Microbiology.* 2009, 58(4), 476-481.
5. AOAC International. Official Methods of Analysis, 17th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2000.
6. Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Pourrat, A.; Legret, P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J. Pharmacie de Belgique.* 1994, 49, 462–470.
7. Autoclave Safety and Operation, 2015, Division of Research Safety, University of Illinois. at Autoclave Use, Environmental Health & Safety, Princeton University. at Proper Use of a Steam Autoclave, 2016, Environmental Health & Safety, Arizona State University.
8. Bascones-Martínez, A.; Mudarra-Morante, S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y prespectiva actual. *Revista Clínica de Periodoncia Implantol.* 2006, 18, 11–39.
9. Benítez-Azaola, R.; García-Varela, R.; García-García, R. M.; Suárez-Jacobo, A.; Gardineau, G. A.; Altamirano, J.; Serna-Saldívar, S. O. *Listeria monocytogenes* growth inhibition in inoculated fresh panela cheese by the addition of *Rhoeo discolor* aqueous extracts combined with potassium sorbate. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2017, 16, 425–434.

10. Beta, T.; Hwang, T. Influence of heat and moisture treatment on carotenoids, phenolic content, and antioxidant capacity of orange maize flour. *Food Chem.* 2018, 246, 58–64.
- Randhir, R.; Shetty, K. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innov. Sci. Emerg. Technol.* 2007, 8, 197–204.
11. Blieden, T. M. Toot-related issues. *Ann periodontol.* 1999, 4(1), 91-98.
12. Bondet, W.; Williams, B.; Berset, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 1997, 30, 609–615.
13. Bowen, W. H., Koo, H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases, role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms, *Caries Research.* 2011, 45(1), 69-86.
14. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 1995, 28, 25–30.
15. Chamorro, S.; Goñi, I.; Viveros, A.; Hervert-Hernández, D.; Brenes, A. Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed extract and grape pomace. *Eur Food Technol.* 2012, 234, 147-155.
16. Cuastumal-Canacuan, H. G.; Valencia-Murillo, B. L.; Ordóñez-Santos, L. E. Efectos de los tratamientos térmicos en la concentración de vitamina C y color superficial entres frutas tropicales. *Revista Lasallista de Investigación.* 2016, 13, 85–93.
17. Cummins, D.; Creeth, J.E. Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res.* 1992, 71(7), 1439-1449.
18. Davidov-Pardo G, Arozarena I, Mari'n-Arroyo MR (2011) Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *Eur Food Res Technol* 232:211–220.
19. Davidson, P. M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: *Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers*, 2 Ed. Doyle MP, LR Beuchat, TJ Montville (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA. Chap. 29: 593-627.
- Moromi, N. H.; Martínez, C. E.; Gutierrez, I. E.; Ramos, P. D.; Nuñez, L. M.; Burga, S. J.; Tello, J.; Trebejo, I. Efecto antimicrobiano *in vivo* de la infusión de *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. *Odontol Sanmarquina.* 2007, 10(2), 12-14.

20. Davidson, P. M.; Parish, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*. 1989, 43(1), 148–155.
21. Davidson, P.M.; Branen, A. L. 1993. Antimicrobials in Foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. N.Y. De Boer, E. and Stolk-Horsthuis, M. 1977. Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses. *J. Food Protect.*
22. Dilsiz, A.; Aydin, T.; Selim-Yavuz, M. Root Surface Biomodification with an Er:YAG Laser for the Treatment of Gingival Recession with Subepithelial Connective Tissue Grafts. *Photomed Laser Surg.* 2010, 28(4), 511–517.
23. Dimler, R. J.; Schaefer, W. C.; Wise, C. S.; Rist, C. E. Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides. *Anal. Chem.* 1952, 24, 1411–1414.
24. Domínguez, M. C.; de la Rosa, M.; Borobio, M. V. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, 47, 391–400.
25. Eichner, H. Antioxidative effect of Maillard reaction intermediates. In *Progress in Food Nutrition and Science*; Ericksson, C., Ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1981; pp. 441–451.
26. Elhamirad, H. A.; Zamanipoor, M. H. Thermal stability of some flavonoids and phenolic acids in sheept allow olein. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2012, 114, 602–606.
27. Espejel, M. M.; Martínez, R. M.; Delgado, R. J. M; Guzmán, F. C. E; Monterde, C. M. E. Gingivitis. *Rev ADM.* 2002, 59, 216-219.
28. Esquivel-Gonzales, B. E.; Ochoa-Martínez, L. A.; Rutiaga-Quiñones, O. M. Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Latinoamericana Tecnología Postcosecha.* 2015, 16, 180–192.
29. Felix, A. C. S.; Alvares, L. D. G.; Santana, R. A.; Valasques-Junior, G. L.; Bezerra, M. A.; Oliveira-Neto, N. M.; de Oliveira-Lima, E.; de Oliveira-Filho, A. A.; Franco, M.; do Nascimento-Junior, B. B. Application of experimental designs to evaluate the total phenolics content and antioxidant activity of cashew apple bagasse. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2018, 17, 165–175.
30. Fernández-Riverón, F.; López-Hernández, J.; Ponce-Martínez, L.M.; Machado-Betarte, C. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 2003, 32, 44–52.

31. FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª Edición, 2004 vol I-II.
32. Gallegos-Vázquez, C.; Scheinvar, L.; Núñez-Colín, C. A.; Mondragón, J. C. Morphological diversity of xoconostles (*Opuntia* spp.) or acidic cactus pears: a Mexican contribution to functional. *Foods Fruits*. 2012, 67(2), 109-120.
33. González-Cruz, L.; Hernández-Castillo, J. B. E.; Juárez-Gpiz, J. M. S.; Flores-Martínez, N. L.; Bernardino-Nicanor, A. Effect of traditional thermal treatment on the antioxidant activity and carotenoids content of nopalitos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2018, 17, 823–833.
34. González, M. J.; Torres, J. L.; Medina, I. Impact of thermal processing on the activity of gallotannins and condensed tannins from *Hamamelis virginiana* used as functional ingredient in seafood. *J Agric Food Chem*. 2010, 58, 4274–4283.
35. Gutiérrez-Tlahque, J.; Aguirre-Mancilla, C. L.; Raya-Pérez, J. C.; Ramírez-Pimentel, J. G.; Jiménez-Alvarado, R.; Hernández-Fuentes, A. D. Effect of climate conditions on total phenolic content and antioxidant activity of *Jatropha dioica* Cerv. var. *dioica*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 2018, 45, 70–81.
36. Hamada. S.; Slade, H. D.; Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*. 1980, 44(2), 331-84.
37. Hashemi, S. R.; Zulkifli, I.; Zunita, Z.; Somchit, M. N. The effect of selected sterilization method on antibacterial activity of aqueous extract of herbal plants. *Biol. Sci*. 2008, 8, 1072–1076.
38. Hayek, S. S.; Ibrahim, S. A. Antimicrobial activity of xoconostle pears (*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium. *International Journal of Microbiology*. 2012, 2012, 368472.
39. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalain stability and degradation products from purified betanin, phyllocactin and hydroxybetanin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2006, 19, 2603–2616.
40. Hernández-Fuentes, A. D.; Trapala-Islas, A.; Gallegos-Vázquez, C.; Campos-Montiel, R. G.; Pinedo-Espinoza, J. M.; Guzmán-Maldonado, S. H. Physicochemical variability and nutritional and functional characteristics of xoconostles (*Opuntia* spp.) accessions from Mexico. *Fruits*. 2015, 70, 109–116.

41. Holley, R. A.; Patel, D. Improvement in Shelf-Life and Safety of Perishable Foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials. *Food Microbiology*. 2005, 22, 273-292.
42. Hu, J.; Wang, J.; Li, S.; Yang, B.; Gong, M.; Li, X.; Zhang, L.; Tian, J. Phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities analysis of extracts from *Vaccinium bracteatum* Thunb. Leaves. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2016, 89, 150–155.
43. Hung, W. C.; Tsai, J. C.; Hsueh, P. R.; Chia, J. S.; Teng, L. J. Species identification of mutans streptococci by groESL gene sequence. *Journal of medical microbiology*. 2005, 54, 857-862.
44. Inaba, H.; Amano, A. Roles of oral bacterial in cardiovascular diseases from molecular mechanisms to clinical cases, implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010, 113(2), 103-109.
45. Jagota, S. K.; Dani, H. M. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using folin phenol reagent. *Anal. Biochem.* 1982, 127, 178–182.
46. Jelvehgaran, Z. F.; Kadkhoda, Z.; Saeed, S. E.; Hossein, M. S. S. Antibacterial Effect of an Herbal Product *Persica* on *Porphyromonas Gingivalis* and *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*: An In-Vitro Study. *ResearchGate*. 2014, 11(4), 464-472.
47. Kerr, J. E.; Abramian, J. R.; Dao, D. H.; Rigney, T. W.; Fritz, J.; Pham, T.; Gay, I.; Parthasarathy, K.; Wang, B.; Zhang, W.; Tribble, G. Genetic exchange of fimbrial alleles exemplifies the adaptive virulence strategy of *Porphyromonas gingivalis*. *PloS one*. 2014, 9(3), 1-15.
48. Kim, E. S.; Liang, Y. R.; Jin, J.; Sun, Q. F.; Lu, J. L.; Du, Y. Y.; Lin, C. Impact of heating on chemical composition of green tea liquor. *Food Chem.* 2007, 103, 1263–1267.
49. Kim, S. Y.; Jeong, S. M.; Park, W. P.; Nam, K. C.; Ahn, D. U.; Lee, S. C. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chem.* 2006, 97, 472–479.
50. Kuskoski, M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênciae Tecnologia de Alimentos*. 2005, 25, 726–732.
51. Larrauri, J. A.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *J Agric Food Chem.* 1997, 45, 1390–1393.

52. LInossier, A. C.; Valenzuela, C. Y. Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo *mutans*, según edad, evaluado en saliva por un método semicuantitativo. *Revista Chilena de Infectología*. 2011, 28(3), 230-237.
53. López-García, F.; Jiménez-Martínez, C.; Guzmán-Lucero, D.; Maciel-Cerda, A.; Delgado-Macuil, R.; Cabrero-Palomino, D.; Terrés-Rojas, E.; Arzate-Vázquez, I. Physical and chemical characterization of a biopolimer film made with corn starch and nopal xocconostle (*Opuntia joconostle*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2017, 16, 147–158.
54. López-Malo, A.; Guerrero, S.; Alzamora, S. M. Probabilistic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, pH, and potassium sorbate concentration. *J Food Prot.* 2000, 63(1), 91-95.
55. López-Palestina, C. U.; Aguirre-Mancilla, C. L.; Raya-Pérez, J. C.; Ramírez-Pimentel, J. G.; Gutiérrez-Tlahque, J.; Hernández-Fuentes, A. D. The Effect of an Edible Coating with Tomato Oily Extract on the Physicochemical and Antioxidant Properties of Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) Fruits. *Agronomy*. 2018, 8, 1–14.
56. Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.; Lerici, C. Review of nonenzymatic browning and antioxidant capacity in processed food. *Trends Food Sci. Technol.* 2011, 11, 340–346.
57. Maraghehpour, B.; Khayamzadeh, M.; Najafi, S.; Kharazifard, M. Traditionally used herbal medicines with antibacterial effect on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: *Boswellia serrata* and *Nigella sativa*. *J Indian Soc Periodontol.* 2016, 20, 603-607.
58. Martínez, M. C. Estudio de las cepas de Estreptococos del grupo *mutans* presents en binomios madre-hijo. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2009, 21(2), 177-185.
59. Martínez, N.; Almaguer, G.; Vázquez-Alvarado, P.; Figueroa, A.; Zuñiga, C.; Hernández-Ceruelos, A. Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida, daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2014, 13, 437–457.
60. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959, 31, 426–428.

61. Molina-Frechero, N.; Castañeda-Castaneira, E.; Gaona, E.; Mendoza-Roaf, P.; González-Montemayor, T. Consumo de productos azucarados y caries dental en escolares. *Rev Mex Pediatr.* 2004, 71(1), 14-6.
62. Morales, P.; Ramírez-Moreno, E.; Sánchez-Mata, M.; Carvalho, A. M.; Ferreira, I. Nutricional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xocostles cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Res. Int.* 2012, 46, 279–285.
63. Mujumdar, A. M.; Misar, A. V. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 90, 11–16.
64. Nakano, K.; Nomura, R.; Nakagawa, I. Demonstration of *Streptococcus mutans* with cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004, 42(1), 198-202.
65. Nilsson, T. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Langbrukshogskolans Ann.* 1970, 36, 179–219.
66. Nychas, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In G.W. Gould (ed.). *New Methods of Food Preservation.* 1995. Chapman and Hall. Glasgow. 58-89.
67. Ojeda-Garcés, J. C.; Oviedo-García, E. O.; Salaas, S. A. *Streptococcus mutans* and dental caries. *Revista CES Odontología.* 2013, 26(1), 44-56.
68. Ojeda-Garcés, J. C.; Oviedo-García, E. O.; Salas, L. A. *Streptococcus mutans* and dental caries. *Revista CES Odontología.* 2013, 26, 44–52.
69. Orrego-Cardozo, M.; Parra-Gil, M. A.; Salgado-Morales, Y. P.; Muñoz-Guarín, E.; Fandiño, H. V. *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *CES Odontología.* 2015, 28(1).
70. Parizi, J. L.; Nai, G. A. Amalgam tattoo: a cause of sinusitis? *J Appl Oral Sci.* 2010, 18 (1), 100-4.
71. Pastene, E. R. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2009, 8, 449–455.
72. Paster, B. J.; Olsen, I.; Aas, J. A.; Dewhirst, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* 2006, 42, 80–87.
73. Paster, B. J.; Olsen, I.; Aas, J. A.; Dewhirst, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* 2006, 42, 80-87.

74. Pérez-Grijalva, B.; García-Zabadúa, J. C.; Ruíz-Pérez, V. M.; Téllez-Medina, D. I.; García-Pinilla, S.; Guzmán-Gerónimo, R. I.; Mora-Escobedo, R. Biofunctionality, colorimetric coefficients and microbiological stability of blackberry (*Rubus fruticosus* var. *Himalaya*) juice under microwave/ultrasound processing. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2018, 8, 13–28.
75. Pimentel-Ramirez, E.; Castillo-Andamayo, D.; Quintana Del Solar, M.; Maurtua-Torres, D.; Villegas-Vílchez, L.; Días-Santisteban, C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev Estomatol Herediana*. 2015, 25(3), 268-277.
76. Pokorný, J. The impact of food processing in phytochemicals; the case of antioxidants. In *Phytochemical Functional Foods*, 1st ed.; Johnson, I., Williamson, G., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 2003; Volume 1, pp. 298–312. 31.
77. Popova, C.; Dosseva-Panova, V.; Panov, V. Microbiology of periodontal diseases. A review. *Medical Biotechnology*. 2013, 27(3), 3754-3759.
78. Portilla-Robertson, J.; Domínguez-Limón, G.; Gaitán-Cepeda, L. A.; Gutiérrez-Venegas, G.; Pinzón-Tofiño, M. E.; Azuara, J.; Sánchez-Hernández, F. Valoración clínica de una goma de mascar con xilitol (Trident val-u-pack). *Revista de la Asociación Dental Mexicana*. 2010, 67, 65-71.
79. Poveda-Romero, M.; Sánchez-García, S.; Medina-García, E.; Espinel-Bermúdez, M. C.; Ríos-Szalay, E.; Fernández-Pedrero, J. A. Gluconato de clorhexidina a 10.12 % en la inhibición de la adherencia del *Streptococcus mutans* en restauraciones provisionales de polimetil metacrilato in vitro. *Revista Odontológica Mexicana*. 2006, 10, 24–29.
80. Ramos-Perfecto, D.; Moromi-Nakata, H.; Martínez-Cadillo, E. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*. 2014, 14(1), 34-8.
81. Randhir, R.; Kwon, Y. I.; Shetty, K. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain and sprouts and seedling. *Innov. FoodSci. Emerg. Technol.* 2008, 9, 355–364.
82. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1231–1238.

83. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1231-1238.
84. Renukas, S.; Muralidharan, N. P. Comparison in benefits of herbal mouthwashes with chlorhexidine mouthwash: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2017, 10(2), 1-7.
85. Rodríguez-Sauceda, E. N. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra, X*, vol. 7 (1). 2011, 153-170, Universidad Autónoma Indígena de México El Fuerte, México.
86. Rodríguez-Sauceda, E. N.; Ximhai, R. Natural antimicrobial agent use in the preservation of fruits and vegetables. *Res. Gate.* 2011, 7, 153–170.
87. Roldán, S.; Herrera, D.; O'Connor, A.; González, I.; Sanz, M. A. Combined therapeutic approach to manage oral halitosis: a 3-month prospective case series. *J Periodontol.* 2005, 76(6), 1025-1033.
88. Ross, C. F.; Hoye, C.; Fernandez-Plotka, V. C. Influence of heating on the polyphenolic content and antioxidant activity of grape seed flour. *J Food Sci.* 2011, 76, 884–890.
89. Salmon, S. A.; Watts, J. L.; Aarestrup, F. M.; Pankey, J. W.; Yancey, R. J. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J. Dairy Sci.* 1998, 81, 570–578.
90. Serra, A. A.; Nuttens, A.; Larvor, V.; Renault, D.; Couée, I.; Sulmon, C. Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2013, 64, 2753–2766.
91. Shaimaa, G. A.; Mahmoud, M. S.; Mohamed, M. R.; Emam, A. A. Phytochemical screening, antioxidant activities and in vitro anticancer potential of Egyptian Capsicum spp. *Biochem. Pharmacol.* 2016, 5, 1–8.
92. Silva-Belmares, Y.; Rivas-Morales, C.; Viveros-Valdez, E.; Cruz-Galicia, M. G.; Carranza-Rosales, P. Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots. *Pak. J. Biol. Sci.* 2014, 17, 748–750.


93. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1956, 16, 1444–1458.
94. Skandamis, P. N.; Nychas, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Appl Microbiol.* 2001, 91(6), 1011-1022.
95. Socransky, S. S.; Haffajee, A. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology.* 2002, 28, 12-55.
96. Spratt, D. A.; Daglia, M.; Papetti, A.; Stauder, M.; O'Donnell, D.; Ciric, L.; Tymon, A.; Repetto, B.; Signoretto, C.; Hourii-Haddad, Y.; Feldman, M.; Steinberg, D.; Lawton, S.; Lingstrom, P.; Pratten, J.; Zaura, E.; Gazzani, G.; Pruzzo, C.; Wilson, M. Evaluation of plant and fungal extracts for their potential antigingivitis and anticaries activity. *Journal of Biomedical Biotechnology.* 2012, 510198.
97. Stintzing, F. C.; Herbach, K. M.; Mosshammer, M. R.; Carle, R.; Yi, W.; Sellapan, S.; Akoh, C. C.; Bunch, R.; Felker, P. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 442–451.
98. Venancio, G. N.; Rodrigues, I. C.; Souza, T. P.; Marreiro, R. O.; Bandeira, M. F. C. L.; Conde, N. C. O. Herbal mouthwash based on Libidibia férrea: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, Ph and density. *Revista de Odontología Da UNESP.* 2015, 44(2), 118-124.
99. Venancio, G. N.; Rodríguez, I. C.; Souza, T. P., Marreiro, R. O.; Bandeira, M. F. C. L.; Conde, N. C. O. Herbal mouthwash based on Libidibia ferrea: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2015, 44(2), 118-124.
100. Waizel-Bucay, J.; Martínez-Rico, I. M. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista Asociación Dental Mexicana.* 2011, 68, 73–88.
101. Wang, H.; Helliwell, K. Epimerisation of catechins in Green tea infusions. *Food Chem.* 2000, 70, 337-344.
102. Wang, H.; Helliwell, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chem,* 2000, 70, 337–344.
103. Wong-Paz, J. E.; Castillo-Inungaray, M. L.; López-López, L.; Contreras-Esquivel, J.C.; Nevárez-Moorillon, G. V.; Aguilar, C. N. *Jatropha dioica* Fuente potencial de agentes

- antimicrobianos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2010, 2, 1–5.
104. Wong-Paz, J. E.; Contreras-Esquivel, J. C.; Rodríguez-Herrera, R.; Carrillo-Inungaray, M. L.; López, L.; Nevárez-Moorillón, V.; Aguilar, C. N. Total phenolic content, *in vitro* antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2015, 8, 104–111.
105. Yin, Q.; Mu, H.; Zeng, M.; Gao, D.; Qin, F.; Chen, J.; He, Z. Effects of heating of the total phenolic content, antioxidant activities and main functional components of simulated Chinese herb candy during boiling process. *J. Food Meas. Charact.* 2018, 1–11.
106. You, J.; Ahmed, M.; Goktepe, I.; Dai, J. Peanut skin proanthocyanidins: composition and antioxidant activities as affected by processing. *J Food Comp Anal.* 2006, 19, 364–371.
107. Yu, X.; Zhao, M.; Hu, J.; Zeng, S.; Bai, X. Correspondence analysis of antioxidant activity and UV-Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants. *Food Sci. Technol.* 2012, 46, 1–9.
108. Zaika, L. L. Spices and Herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety.* 1988, 9, 97-117.
109. Zaura, E. Dental Plaque as a Biofilm: A Pilot study of the effect of Nutrients on Plaque pH an dentin Demineralization. *Caries Research.* 2004, 38, 9-15.

VIII Anexos

Article

Effects of Sterilization on Bioactives of *Jatropha dioica* and *Opuntia oligacantha* Extracts, and on Antimicrobial Capacity against *Streptococcus mutans*

Jorge Terrazas-Hernández ¹, Eva M. Santos-López ², Raquel Cariño-Cortés ¹,
Rubén Jiménez-Alvarado ³, César Uriel López-Palestina ⁴  and
Alma Delia Hernández-Fuentes ^{3,*}

¹ Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Ex Hacienda la Concepción s/n Carretera Pachuca-Actopan San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo C.P. 42160, Mexico; jorge_terrazas86@hotmail.com (J.T.-H.); raquelcariñocortes@gmail.com (R.C.-C.)

² Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5., Hidalgo C.P. 42084, Mexico; emsantos@ueah.edu.mx

³ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km. 1, Rancho Universitario, Tulancingo, Hidalgo C.P. 43600, Mexico; rjalvarado@gmail.com

⁴ Tecnológico Nacional de México/I. T. Roque, km. 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Celaya, Guanajuato C.P. 38110, Mexico; clopez_17p@outlook.com

* Correspondence: hfad@hotmail.com

Received: 15 November 2018; Accepted: 4 December 2018; Published: 6 December 2018



Abstract: Natural extracts have been used as antimicrobial agents, and extracts of the rhizomes of the dragon's blood plant (*Jatropha dioica*) and of the fruit of xoconostle 'Ulapa' (*Opuntia oligacantha*) are among these agents. To be able to use the extracts, it is necessary to eliminate their natural microbiota by the means of sterilization methods; however, the effects of thermal sterilization on their properties have not been evaluated. The objective of the study was to evaluate the physico-chemical, antioxidant, and antimicrobial properties of extracts of the rhizomes of dragon's blood and the fruit of xoconostle, when not sterilized, and when sterilized by autoclaving. The contents of phenolic compounds, flavonoids, antioxidant, and antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* were not affected in autoclave-sterilized extracts of dragon's blood rhizomes, and naringenin, apigenin, galagina, vanillic, and caffeic acid were detected, while in autoclave-sterilized extracts of xoconostle fruits, the betalain content decreased, with galagin, gallic, vanillic, and p-coumaric acid being identified. The minimum inhibitory concentration for the extract sterilized by autoclaving dragon's blood was 2 mg/mL, and for the extract sterilized by autoclaving xoconostle, it was 28 mg/mL. Both represent natural alternatives as antimicrobial agents against *S. mutans*.

Keywords: dragon's blood; *Streptococcus mutans*; xoconostle; phenolic compounds; antioxidant activity

1. Introduction

Streptococcus mutans is a Gram-positive bacterial involved in oral health issues, as it is responsible for tooth decay, which triggers other illnesses such as gingivitis and periodontitis [1]. Some of the most commonly used chemical agents to control plaque and tooth decay related to *S. mutans* are chlorhexidine and triclosan; however, long-term use of these substances causes secondary effects such as brown staining in teeth, altered taste, and scaly lesions in the alveolar mucosa [2]. Currently, the use of natural antimicrobial agents with efficient performance in the inhibition of pathogenic



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"
Unidad Académica de Ciencias Químicas

Otorga a:

**J. A. Terrazas-Hernández, R. Jiménez-Alvarado, E. M. Santos-López,
R. Cariño-Cortés, R. G. Campos Montiel, A. Hernández-Fuentes.**

La presente

CONSTANCIA

Por su participación con el trabajo "Extractos del Fruto *Opuntia oligacantha* C. F. Först y la Raíz de la Planta *Jatropha dioica* Cerv. con Actividad Antioxidante y Beneficios Contra Enfermedades Dentales" dentro del IV Congreso Internacional Sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos y al XIX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos realizado del 17 al 19 de mayo del 2017.

A 19 de mayo de 2017, Zacatecas, Zacatecas.


Dra. Ma. del Rosario Abraham Juárez.

Coordinadora del evento
Directora del Departamento de Alimentos-UG


Dra. Victoria Concha Herrera.

Coordinadora del evento


Dr. Juan Gabriel Báez González.

Coordinador del evento
Facultad de Ciencias Biológicas-UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Centro de Lenguas
 Language Center



CEL-CDTOEFL/442/2019

A quien Corresponda:

Por medio de la presente se hace constar que el **C. Terrazas Hernández Jorge Alberto**, presentó un examen Diagnóstico del TOEFL (Test of English as a Foreign Language) aplicado por este Centro, obteniendo, un resultado de **460** puntos equivalentes al nivel **B1** del Marco Común Europeo de Referencia para las lenguas (MCER).

Este comprobante se extiende en la ciudad de Mineral de la Reforma, Hgo., a los veintiocho días del mes de junio de dos mil diecinueve, para los fines a que haya lugar.

ATENTAMENTE
 "Amor, Orden y Progreso"

Lic. Diana Matxalen Hernández Cortes
 Directora



c.c.p. Minutario
 DMHC/ggc



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo, km 4.5 Col. Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México; C.P. 42184
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4581
 centrodelenguas@uaeh.edu.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

ICSa-DCASH-2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al M. en C. Jorge Alberto Terrazas Hernández con número de cuenta 124733, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado “Efecto de la esterilización sobre compuestos bioactivos de los extractos del fruto xoconostle Ulapa (*Opuntia oligacantha*) y de la planta sangre de drago (*Jatropha dioica* sessé ex cerv.) con posible aplicación antimicrobiana en productos bucales”, y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 3 junio 2019.

Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. ALMA DELIA HERNÁNDEZ FUENTES
 Director de tesis

Alma Delia Hernández Fuentes

DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

Rubén Jiménez Alvarado

DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS

Raquel Cariño Cortés

DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ

Eva María Santos López

ATENTAMENTE
 Pachuca, Hidalgo, 25 de junio del 2019
 “Amor, Orden y Progreso”

M.C.Esp. Adrián Moya Escalera
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud
 Dean

Adrián Moya Escalera

M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias
 Jefa del Área Académica de Nutrición
 Chair of Academic Area of Nutrition

Arianna Omaña Covarrubias

Dra. Lydia López Pentigo
 Coordinadora de Posgrado del ICSa
 Director of Graduate Studies of ICSa



Dra. Esther Ramírez Moreno
 Coordinadora del Programa Educativo
 Director of Graduate Studies