

Efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y perfil de compuestos fenólicos de la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) cultivada en Puno.

Mirelia Janeth Talavera Apaza

Doctoris Scientiae en Ciencias de la Salud, docente de la Escuela Profesional de Odontología - Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno; correspondencia: mireliajt@gmail.com

INFORMACIÓN DEL ARTICULO

Art. Recibido 15/marzo/2015
Art. Aceptado 10/agosto/2015
online: 14/setiembre/2015

PALABRAS CLAVE:

* *Matricaria chamomilla* L.
* caries dental
* ácidos fenólicos
* flavonoides

ARTICLE INFO

Article Received 15/march/2015
Article Accepted 10/august/2015
online:14/setember/2015

KEY WORDS

* *Matricaria chamomilla* L.
* dental caries
* phenolic acids
* flavonoids

RESUMEN

Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar el perfil de compuestos fenólicos del extracto y la infusión de manzanilla por cromatografía líquida de alta performance (HPLC-DAD) y evaluar el efecto antibacteriano de la infusión de manzanilla sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), utilizando el test de difusión en disco. Los principales compuestos fenólicos encontrados corresponden a los flavonoides, seguidos por los ácidos fenólicos. El contenido total de compuestos fenólicos en el extracto y en la infusión fueron 37,51 y 26,95 mg/g de peso seco (PS), respectivamente. El extracto de manzanilla presentó mayor contenido de flavonoides comparado con la infusión (21,72 y 15,8 mg/g PS, respectivamente), y mayor contenido de ácidos fenólicos (17,08 y 9,87 mg/g PS, respectivamente). Los derivados de flavonoides detectados fueron apigenina, quercitina, catequina y luteolina y los derivados de ácidos fenólicos fueron p-cumarico y cafeico. La apigenina, fue el mayor compuesto fenólico presente en ambos productos de la manzanilla (12,41 y 10,01 mg/g PS). El contenido de compuestos fenólicos presentes en ambos productos no fue significativamente diferente ($p > 0.01$). La infusión no mostró actividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans* lo que podría indicar que los compuestos fenólicos responsables de estas propiedades, no están en concentraciones adecuadas. Se sugiere realizar estudios en infusiones de manzanilla con mayores concentraciones. En conclusión, el perfil de compuestos fenólicos de ambos productos de manzanilla fue ligeramente diferente. El mayor compuesto fenólico presente corresponde a los flavonoides. La manzanilla es una rica fuente de compuestos fenólicos con importantes propiedades medicinales.

Antibacterial effect against *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and phenolic compounds profile of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) cultivated in Puno.

ABSTRACT

The objectives of this research were to characterized of phenolic compounds profile from extract and infusion of chamomile by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and to evaluate of antibacterial effect from chamomile infusion on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), using the disk diffusion test. The main phenolic compounds encountered corresponded to flavonoids, followed by phenolic acids. The total amount of phenolic compounds in extract and infusion were 37.51 and 26.95 mg/g of dry weight (DW), respectively. Chamomile extract presented major content of flavonoids compared to infusion (21.72 and 15.8 mg/g DW, respectively) and mayor content of phenolic acids (17.08 and 9.87 mg/g DW, respectively). Flavonoids derivatives detected were apigenin, quercetin, catechin and luteolin, and the phenolic acids derivatives, were p-coumaric and caffeic. Apigenin, was the major phenolic compound present in both products of chamomile (12.41 and 10.01 mg/g DW). The content of phenolic compounds presents in both products were not significantly different ($p > 0.01$). The infusion showed no antibacterial activity on *Streptococcus mutans* which could indicate that the phenolic compounds responsible for its antibacterial properties, were not in adequate concentrations. It suggests performing studies in infusions of chamomile with concentrations above. In conclusion, phenolic compounds profiles from both products of chamomile were slightly different. Chamomile is a rich source of phenolic compounds with important medicinal properties. Major phenolic compound corresponded to the flavonoids.

INTRODUCCIÓN

La caries dental, ha sido definida como una enfermedad infecciosa, localizada, transmisible, post eruptiva y muy prevalente, de origen multifactorial, que termina con la destrucción de los tejidos duros del diente; cuando el proceso dinámico constante de desmineralización y remineralización en los dientes, es alterado, por el exceso de producción de ácidos de microorganismos cariogénicos, en combinación con sus factores de virulencia (Liébana, *et al.*, 2002). Sin ser una enfermedad que comprometa la vida, en términos de dolor, deterioro funcional, disminución de la calidad de vida, costosa y con una duración de por vida, es de gran impacto en los individuos y en la sociedad. Constituyéndose actualmente, en una de las patologías bucales más prevalentes y de amplia distribución por todo el mundo, siendo un importante problema de salud pública.

En indicadores epidemiológicos, la Organización Mundial de la Salud (2004), ha declarado que se estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental, que afecta al 60% y 90% de la población escolar, y a la gran mayoría de los adultos. La Organización Panamericana de la Salud (1997) menciona: «La caries dental es la enfermedad más común entre los niños de la región de las Américas; aproximadamente el 90% de los escolares de 5 a 17 años tienen caries dental, sin embargo, gracias a la intervención temprana, puede tratarse o incluso evitarse». El Ministerio de Salud (2005) refiere: «La condición de Salud Bucal en el Perú, atraviesa una situación crítica, debido a la alta prevalencia de enfermedades Odontostomatológicas; siendo la caries dental la enfermedad más prevalente con 90%, y además tiene uno de los índices más elevados de caries dental de América Latina».

Si bien los estudios experimentales en animales y observacionales en humanos, han demostrado que la habilidad de inducir caries dental, no es propiedad exclusiva de una especie en particular, han dejado claramente establecido que los *Streptococcus mutans* de la placa dental, son los microorganismos cariogénicos más asociados a esta enfermedad, por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control se han dirigido hacia la disminución o eliminación de estas bacterias en la cavidad oral (Liébana, *et al.*, 2002; Umar *et al.*, 2005)

Se considera que el *Streptococcus mutans* es sensible a varios agentes antibacterianos utilizados en enjuagues bucales, como la clorhexidina y el triclosán. Estos se emplean preventivamente, en el tratamiento de pacientes con alto número de esta bacteria en la cavidad oral, con el propósito de reducir su número y evitar la generación de caries (Bascones y Morante, 2008; Aguilera *et al.*, 2011). Dentro de ellos, la clorhexidina, es el agente antibacteriano más utilizado, sin embargo, se conoce que su uso prolongado o en exceso, produce efectos adversos en el organismo y en la estética oral (Matur *et al.*, 2011).

Ha surgido de esta forma la necesidad de lograr sustancias antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans* que puedan ser utilizadas como enjuagues bucales y sin tales efectos colaterales. Las plantas y sus propiedades antimicrobianas, son una alternativa válida; sus productos naturales, no son tóxicos, tienen menos efectos secundarios que las drogas sintéticas, y son accesibles a precios asequibles (Chandrasekaran *et al.*, 2010). Dentro de ellas tenemos a la *Matricaria chamomilla* L. (Asterácea), comúnmente conocida como manzanilla. Sus propiedades antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans*, han sido investigadas mediante extractos y aceites esenciales, preparados

a partir de sus flores secas, demostrándose su acción en el control de la placa dental (Sainz de Net y Ruiz, 2004; Albuquerque *et al.*, 2010; Cárcamo *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2013), sin embargo, la infusión de manzanilla ha demostrado que tiene múltiples beneficios médicos bien conocidos, pero su posible uso como antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* no reúne muchas referencias.

Se ha planteado el estudio del efecto antibacteriano in vitro de la infusión de manzanilla sobre el *Streptococcus mutans*, para que pueda ser utilizada como enjuague bucal, considerando que la infusión es, por mucho, de fácil acceso, bajo costo, se encuentra al alcance de cualquier persona, no presenta efectos secundarios indeseables, además su elaboración es sencilla. Características que permitirían su utilización como enjuague bucal, luego del cepillado dental, en una mayor población y, de esta forma ayudar en la prevención y disminución de la incidencia de caries dental.

Muchas de las propiedades que se le han atribuido a las plantas utilizadas en la medicina tradicional, para aliviar o curar una serie de dolencias en el hombre, estarían muy relacionadas con los principios activos que ellas presentan. Por lo que, se hace necesario identificarlos, para poder encontrar la relación causa-efecto que ellos producen en la prevención o cura de enfermedades. Troncoso *et al.*, (2005), ha establecido que estos principios activos, no son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto significativo en el curso de un rango de enfermedades.

Dentro de este grupo de principios activos, se encuentran los compuestos fenólicos, que son comúnmente hallados en las plantas. Entre sus efectos positivos relacionados y reportados en la literatura figuran el actuar como: antiinflamatorio, analgésico, sedante, antialérgico, antimicrobiano, antihiper glucemia, antiespasmódico, entre otros. En la manzanilla, investigaciones recientes apoyan que estos efectos farmacológicos, son en parte debido a los principios activos identificados como compuestos fenólicos (McKay, Blumberg, 2006; Maschi *et al.* 2008; Bozorgmehr *et al.*, 2012; Darvishpadok, 2012).

Mediante la cromatografía líquida de alta performance (HPLC-DAD), se ha realizado la determinación de compuestos fenólicos en el extracto manzanilla (Mulinacci *et al.*, 2000; Srivastava y Gupta, 2009; Nováková *et al.* 2010), en la infusión (Moraes de Souza *et al.* 2008; Muñoz *et al.*, 2012) y en la infusión y decocción a la vez (Guimarães *et al.*, 2013). Consideramos que es importante realizar el análisis por HPLC-DAD del extracto y de la infusión de manzanilla, para poder comparar el perfil de compuestos fenólicos presentes en ambos productos; comparación que podría determinar una relación de causa-efecto de sus propiedades antibacterianas sobre el *Streptococcus mutans*.

La presente investigación tuvo como objetivos principales: caracterizar el perfil de compuestos fenólicos presentes en la infusión y en el extracto de manzanilla mediante el análisis por HPLC-PAD y evaluar el efecto antibacteriano in vitro de la infusión de manzanilla sobre el *Streptococcus mutans* mediante el test de difusión en disco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). Fueron proporcionadas por los productores del centro poblado de *Jayllihuaya*

distrito de Puno, provincia de Puno, departamento de Puno-Perú, durante el año 2014. La identificación taxonómica de la planta fue realizada por el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), Lima- Perú.

Microorganismo. Cepa estandarizada de *Streptococcus mutans* ATCC®25175, adquirida de Microbiologics® Inc., por el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología «Marino Tabusso» – UNALM.

Preparación de las muestras

Recolección, selección, limpieza y desecación. La recolección se realizó de forma manual, cuando la flor estaba en plena apertura, dejando sólo 1 cm de tallo. La muestra se transportó en bolsas de papel correctamente rotuladas. La selección y limpieza se realizó también de forma manual, solo se consideraron las flores que no presentaran daños físicos ni microbiológicos; se eliminaron los restos de materias extrañas, tierra, entre otros. Las flores se deshidrataron a una temperatura aproximada de 20°C, por 17 días, sobre cajas de cartón cubiertas con papel (Ocampo Sánchez, 2000).

Preparación de las infusiones de 2%, 4% y 8 % de manzanilla. Se pesó 4 g de flores de manzanilla y se le agregó 50 mL de agua mineral esterilizada a 100°C (infusión 8%) se puso en reposo durante 5 minutos y se procedió a filtrar. El líquido obtenido fue esterilizado por filtración en un embudo con papel filtro estéril de 22 µm de poro, a partir de ella se realizaron las infusiones de 4% y 2%, con la misma agua mineral que se usó para el control negativo; procedimiento adaptado de Guimarães *et al.*, 2013.

Preparación del extracto de manzanilla. Se pesó 3,5 gr de flores de manzanilla y se le adicionó 100 mL de metanol 80%, bajo condiciones de oscuridad y con nitrógeno; se agitó vigorosamente por 1 hora a temperatura ambiente, se procede a centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos, se obtuvo un sobrenadante 1; el pellet se adiciona 50 mL de metanol 80%, bajo condiciones de oscuridad y con nitrógeno; se agitó vigorosamente por 30 minutos a temperatura ambiente, se procede a centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos, se obtuvo un sobrenadante 2. Ambos sobrenadantes se mezclan y se procede a realizar el análisis por HPLC-DAD, procedimiento adaptado de Mulinacci *et al.* (2000).

Determinación del perfil de compuestos fenólicos de la manzanilla

Se realizó en la infusión al 2% y en el extracto de la manzanilla, en el Instituto de Biotecnología- Área de Biotecnología Industrial de la UNALM. La extracción de compuestos fenólicos por el método HPLC-DAD, fue tomado de Chirinos *et al.*, (2011), donde se definieron los parámetros de extracción de estos compuestos de la manzanilla. El perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos, presentes en las fracciones obtenidas para ambos productos, fueron determinadas a 280, 320 y 360 nm debido a que la mayor parte de los compuestos fenólicos detectados presentaron máximas absorbancias a esas longitudes de onda. Los análisis cromatográficos se realizaron por triplicado.

La identificación de los picos de los compuestos fenólicos en las flores se realizó con el detector de DAD que es capaz de detectar y registrar simultáneamente cromatogramas a diferentes longitudes de onda logrando obtener en primer lugar los espectros de absorción en un amplio rango UV – visible (de 200 a 700 nm) de los picos de interés y, en segundo lugar de los cromatogramas obtenidos se pueden determinar

los tiempos de retención para cada pico; estas dos características fueron comparadas con la de los estándares de compuestos fenólicos previamente inyectados para lograr identificar a los principales fenólicos presentes en las muestras. Se consideraron como «derivados» a los compuestos fenólicos que presentaron el mismo espectro de absorción al de un estándar fenólico más no el mismo tiempo de retención, de esta forma se obtuvo un panorama del tipo de familias de compuesto fenólico presentes.

Determinación del efecto antibacteriano in vitro de manzanilla por el análisis del test de difusión por disco

Se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología «Marino Tabusso» de la UNALM. Se evaluó el efecto antibacteriano in vitro de la infusión de manzanilla sobre el *Streptococcus mutans*, en tres concentraciones (2%, 4% y 8%). Se tuvo un control positivo C+: clorhexidina al 0,12% y un control negativo C- : agua mineral esterilizada. Se realizó tres repeticiones de cada tratamiento, sumando un total de 15 unidades experimentales.

Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC®25175.

Se procedió a extraer el hisopo que se encontraba en el contenedor de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC®25175, se realizó la siembra en una placa de Agar Muller Hinton y se incubó a 35°C por 24 horas. De esta cepa reactivada se inoculó una asada en caldo nutritivo por un periodo de 24 horas a 28°C en movimiento constante, de acuerdo al manual del proveedor Microbiologics® Inc. que viene junto con la cepa estandarizada.

Preparación del inóculo. Del cultivo de *Streptococcus mutans* de 24 horas se extrajo una alícuota de 1000 µL y se procedió a medir al espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. A partir de este se realizó una dilución en caldo nutritivo hasta alcanzar los 0.5 McFarland. De esta dilución se agregó 100 µL a cada placa y se extendió con un asa de digralsky, luego, se dejó secar por aproximadamente 15 minutos (Negroni, 2010).

Colocación de discos de antimicrobiano. Se sumergieron 5 discos de 5 mm de diámetro y 0.02 mm de espesor en cada una de las infusiones (8%, 4% y 2%) y en los controles positivo, clorhexidina al 0,12% (C+) y negativo, agua mineral esterilizada (C-) se dejó en incubación a 35°C por 24 horas (Negroni, 2010).

Medición de los halos de inhibición. Después de retirar la placa de la incubadora, se examinó detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que se pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano (Negroni, 2010).

Análisis estadístico

Se determinó el promedio aritmético del halo de inhibición de la clorhexidina (C+); del contenido de compuestos fenólicos totales, de ácidos fenólicos y de flavonoides presentes en ambos productos de la manzanilla. Se utilizaron gráficos para comparar los mg/g muestra de los compuestos fenólicos presentes en ambos productos. Se utilizó la prueba estadística t de student, para comparar el perfil de compuestos fenólicos presentes en ambos productos y poner a prueba las hipótesis, determinando diferencias estadísticamente significativas o no. Los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$.

RESULTADOS

1. Perfil de compuestos fenólicos presentes en la manzanilla analizados por HPLC-DAD

Compuestos fenólicos presentes en la infusión. El cromatograma HPLC-DAD de la infusión de manzanilla se registró a 280 nm (Figura 1). Se detectaron un total de 29 picos, los cuales presentaron tiempos de retención entre los 25.44 y 90.25 minutos. Los picos detectados mostraron características espectrales UV-Vis similares a los compuestos fenólicos tales como: 1) Derivados de ácidos fenólicos hidroxicinámicos picos 1, 3, 4, 6, 7, 14, 15, 18-20, 23 (cuantificados como ácido cafeico a 320 nm) y picos 28 y 29 (cuantificados como ácido α -cumárico a 320 nm); 2) Derivados de flavonoides picos 2 y 9 derivado de flavanol (cuantificado como catequina a 280 nm); picos 8, 10, 12, 13, 17 y 21 derivado de flavonol (cuantificados como quercitina a 360 nm), pico 11 derivado de flavona (cuantificado como luteolina a 320 nm) y picos 16, 22, 24, 25-27 (cuantificados como apigenina a 320 nm). El pico más representativo fue el 16 (apigenina).

Compuestos fenólicos presentes en el extracto. El cromatograma HPLC-DAD del extracto de manzanilla se registró a 280 nm (Figura 2). Se detectaron un total de 25 picos, los cuales presentaron tiempos de retención entre los 36,37 y 90.26 minutos. Los picos detectados mostraron características espectrales UV-Vis similares a compuestos fenólicos tales como: 1) Derivados de ácidos fenólicos hidroxicinámicos picos 1, 3, 4, 11, y 15 (cuantificados como ácido cafeico a 320 nm); picos 18, 23-25 (cuantificados como ácido α -cumárico a 320 nm) y pico 2 (cuantificado como ácido clorogénico a 320 nm); 2) Derivados de flavonoides pico 6 derivado de flavanol (cuantificado como catequina a 280 nm); picos 5, 7, 9, 10, 13 y 14 derivado de flavonol (cuantificados como quercitina a 360 nm); picos 8 y 16 derivado de flavona (cuantificados como luteolina a 320 nm) y picos 12, 17, 19-21 (cuantificados como apigenina a 320 nm); pico 22 derivado de flavanona (cuantificado como eriodictiol a 280 nm). El pico más representativo fue el 25 (α -cumárico).

Contenido total de compuestos fenólicos. El extracto presentó mayor valor medio de cantidad total de compuestos fenólicos que la infusión (Figura 3). El contenido de compuestos fenólicos totales no fue estadísticamente diferente, entre ambos productos de manzanilla ($p>0,01$).

Contenido de compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos y flavonoides. El extracto presentó mayor valor medio de concentración de ácidos fenólicos y flavonoides que la infusión (Figura 4). El contenido de ácidos fenólicos y flavonoides no fue estadísticamente diferente entre ambos productos de la manzanilla ($p>0,01$).

Contenido de derivados de ácidos fenólicos. El extracto presentó mayor contenido del ácido fenólico hidroxicinámico tipo α -cumárico y la infusión mayor contenido del ácido fenólico hidroxicinámico tipo cafeico (Figura 5). El contenido de los ácidos fenólicos hidroxicinámicos α -cumárico y cafeico no fue estadísticamente diferente entre ambos productos de la manzanilla ($p>0,01$).

Contenido de derivados de flavonoides. La infusión presentó mayor concentración del flavonoide tipo flavanol, y el extracto presentó mayor concentración de flavonoides tales como flavonol y flavona; sólo el extracto presentó el flavonoide tipo flavanona (Figura 6). El contenido

de flavonoides tales como flavanol, flavonol y flavona no fue estadísticamente diferente entre ambos productos de la manzanilla ($p>0,01$).

Contenido de derivados de los flavonoides tipo flavanol, flavonol, flavona y flavanona. La infusión presentó mayor concentración de flavanol tipo catequina y el extracto presentó mayor concentración de flavonol tipo quercitina, de flavonas tales como luteolina y apigenina, sólo el extracto presentó flavanona tipo eriodictiol (Figura 7). El contenido de catequina, quercitina, luteolina y apigenina no fue estadísticamente diferente entre ambos productos de la manzanilla ($p>0,01$).

2. Efecto antibacteriano in vitro de las infusiones al 2%, 4%, 8% de manzanilla, sobre el *Streptococcus mutans*.

No se evidencia halos de inhibición en las infusiones de manzanilla al 2%, 4% y 8%, tampoco en el control negativo (C-) agua mineral esterilizada; si se evidencia halos de inhibición de 2.5 mm en promedio en el control positivo (C+) colutorio de clorhexidina al 0,12% (Figura 8).

DISCUSIÓN

Esta es la primera investigación que realiza la determinación del efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC@25175) y del perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD del extracto y la infusión de manzanilla cultivada en Jayllihuaya-Puno.

Mediante el análisis HPLC-DAD, se observó que la infusión y el extracto de manzanilla, mostraron perfiles cromatográficos de compuestos fenólicos ligeramente diferentes. En relación al perfil cualitativo, ambos productos presentaron los mismos compuestos fenólicos: ácidos fenólicos (α -cumárico y cafeico) y flavonoides (apigenina, quercitina, catequina y luteolina), a excepción del flavonoide eriodictiol que sólo estuvo presente en el extracto. La presencia de estos compuestos fenólicos detectados en ambos productos de la manzanilla cultivada en Jayllihuaya-Puno, sería un indicador de beneficios sobre la salud general y bucal.

Srivastava y Gupta, (2009); Mulinacci *et al.* (2000) y Nováková *et al.* (2010), informaron como principal compuesto fenólico detectado a la apigenina glucósido 7-O y otros derivados de apigenina; resultados similares a la presente investigación que detectó a la apigenina como principal compuesto fenólico presente en la infusión y en el extracto de manzanilla.

También Franke y Schilcher, (2005) refieren que el contenido de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de flor de manzanilla es el factor de calidad, y que la apigenina es un constituyente mayoritario de este extracto; en la presente investigación se encontró también estos resultados en ambos productos de manzanilla. Al respecto LaAvallone *et al.*, (2000); Srivastava y Gupta, (2009); Srivastava *et al.*, (2010), indican además que entre los flavonoides, la apigenina es el compuesto más prometedor y que está presente en cantidades muy pequeñas como apigenina libre, pero existe predominantemente en la forma de vaños glucósidos. De acuerdo a los autores mencionados, y siendo la apigenina el principal compuesto encontrado en manzanilla estudiada, podemos indicar que esta planta tiene un alto factor de calidad. Guimarães *et al.*, (2013) reportó como principal compuesto luteolina O-acyhexoside,

en nuestro estudio fue detectado como luteolina, aunque en mínima cantidad.

Muñoz *et al.*, (2012), realiza su estudio en infusiones de 04 marcas comerciales (A, B, C, D), reporta que en las infusiones de manzanilla de las marcas D y C se identificaron el ácido cafeico, umbeliferona, apigenina y hemiarina; mientras que para las marcas A y B, la quercetina también estuvo presente, además de los compuestos encontrados en las marcas D y C; sin embargo, hay que destacar que la mayoría de estos compuestos se encontraron en cantidades traza. Mulinacci *et al.* (2000), reportó flavonoides y grandes cantidades de ácido cafeico y ácido ferúlico. Moraes de Souza *et al.* (2008), identificó en la infusión miricetina, kaempferol y quercetina. La presente investigación detectó los flavonoides apigenina, quercitina, catequina y luteolina y los ácidos fenólicos p-cumárico y cafeico y los flavonoides apigenina, quercitina, catequina y luteolina, a excepción del flavonoide erodictiol que sólo estuvo presente en el extracto.

Como se puede observar, los autores mencionados han encontrado perfiles cromatográficos cualitativos de compuestos fenólicos diferentes a los obtenidos en este estudio; esta variación probablemente se debería a lo mencionado por Salamon, (2007) y Bravo y Jiménez (2011), quienes refieren que puede existir variación cualitativa y cuantitativa de compuestos fenólicos presentes en la manzanilla. y en otras plantas, por varios factores como la variabilidad genética de las plantas, etapa del desarrollo de la planta, la composición del suelo, el clima, el método de cosecha, almacenamiento post cosecha, el muestreo, las prácticas de elaboración, el método de análisis, entre otros.

Moraes de Souza *et al.* (2008), indica también en relación a los factores que podrían afectar el contenido de compuestos fenólicos encontrados en infusiones, a la forma de preparación (planta procesamiento, concentración, tiempo y temperatura de infusión), la hierba (especie, parte utilizada, etapa de desarrollo), las características de cultivo (suelo, clima, tensiones) y el método de análisis.

En el perfil cromatográfico cuantitativo determinado, el extracto presentó mayor concentración de compuestos fenólicos que la infusión, resultados similares a los reportados por Guimarães (2013) y Nováková *et al.* (2010); estas diferencias en la concentración de compuestos fenólicos entre ambos productos de la manzanilla, se deben probablemente a la forma de extracción de estos compuestos. En relación a la comparación de la cuantificación de compuestos fenólicos detectados en el presente estudio, no se puede realizar la comparación con los estudios de Mulinacci *et al.*, (2000); Srivastava y Gupta, (2009); Nováková *et al.* (2010), Muñoz *et al.*, (2012) y Guimarães *et al.*, 2013, debido a que los autores mencionados expresan la cuantificación en diferentes unidades de medida. Sólo con Moraes de Souza *et al.* 2008; quien identifica la quercetina con una concentración de 2,36 mg/g y el presente estudio detectó quercetina en mayor cantidad, 4,98 mg/g muestra.

Los resultados de la presente investigación evidenciaron, que no existe efecto antibacteriano in vitro de las infusiones de manzanilla sobre el *Streptococcus mutans*, sólo la clorhexidina al 12% utilizada como control positivo, tuvo efecto antibacteriano sobre este microorganismo; probablemente debido a que, los compuestos fenólicos responsables de la actividad antibacteriana de manzanilla se encuentran presentes, pero no en las concentraciones adecuadas, lo que nos plantearía realizar investigaciones en infusiones con mayor concentración al 8%. Por otro lado, la variación del efecto inhibitorio entre las infusiones estudiadas

y la clorhexidina al 0,12%, es explicable debido a que, la infusión está compuesta por concentraciones de diversos de metabolitos y otras sustancias propias de las plantas, mientras que la clorhexidina es un producto químico, cuya concentración de principios activos es mucho mayor, tal como refieren Bascones y Morante (2008).

CONCLUSIONES

El extracto y la infusión de manzanilla cultivada en Jaylluyaya-Puno, presentaron perfiles cromatográficos, de compuestos fenólicos detectados por HPLC-DAD, ligeramente diferentes; presentaban los mismos tipos de compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y flavonoides, sin embargo, hubo diferencias en la concentración. La presencia de este tipo de compuestos fenólicos sería un indicador de posibles beneficios sobre la salud bucal.

La infusión de manzanilla no presentó efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC®25175), probablemente porque, los compuestos fenólicos, responsables de sus propiedades antibacterianas, no se encuentran en concentraciones adecuadas. Se sugiere realizar estudios en infusiones con concentraciones mayores al 8%.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para la realización y culminación de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilera C., Romano E., Ramos N., & Rojas L., (2011). Sensibilidad del *Streptococcus mutans* a tres enjuagues bucales comerciales. *ODOUS CIENTIFICA*, 12 (1):7-13.
- Albuquerque A.C.L., Pereira M.S.V., Costa M.R.M., Pereira L.F. & Higo J.S., (2010). «Efeito antimicrobiano do extrato da *Matricaria recutita* Linn. (camomila) sobre microrganismos do biofilme dental». *Pesq Bras Odontope Clin Integr*, Joao Pessoa, 10(3), 451-455.
- Avallone R., Zanolli P., Puia G., Kleinschnitz M., Schreier P., & Baraldi M., (2000). Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1387-1394.
- Bascones A. & Morante S., (2008). «Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual». *Avances en Periodoncia*, 18(1), 31-59.
- Bozorgmehr B., Mojab F., & Faizi M., (2012). «Evaluation of sedative-hypnotic effect of ethanolic extract of five medicinal plants; *Nepeta menthoides*, *Matricaria chamomilla*, *Asperugo procumbens*, *Lippia citriodora* and *Withania somnifera*». *Res Pharm Sci*, 7(5):S831.
- Cárcamo V., Oliva P. & González P., (2011). «Efectividad antimicrobiana del colutorio de *Matricaria recutita*, en funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo». *Int. J. Odontostomat*, 5 (2), 179-184.

- Chandrasekaran C.V., Sundarajan K., David K., & Agarwal A., (2010). «In vitro efficacy and safety of poly-herbal formulations». *Toxicol. In Vitro*, 24(3), 885–897.
- Chirinos R., Huamán M., Betalleluz-Pallardel I., Pedreschi R., & Campos D., (2011). «Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying». *Food Chemistry*, 128, 711–716.
- Darvishpadok A., Azemi M., Namjoan F., Khodayar M., Ahmadpour F., & Panahi M., (2012). «Effect of *Matricaria chamomilla* L. on blood glucose and glycosylated hemoglobin in female fertile diabetic rats». *Res Pharm Sci*; 7: S19.
- Franke R., & Schilcher H., (2005). Chamomile. Industrial Profiles. Medical and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Taylor & Francis, Florida. 289 p.
- Guimarães R., Barros L., Dueñas M., Calheta R.C., Carvalho A.M., Santos-Buelga C., Queiroz M.J., & Ferreira IC. (2013). Infusion and decoction of wild *German chamomile*: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chem*, 136(2):947-54.
- Liébana J., Gonzales M., Liebana M.J. & Parra M., (2002). Composición y ecología de la microbiota oral. En *Microbiología Oral*, Liébana J. (Ed). Madrid, España: Mac Graw-Hill Interamericana, 2ª. Edición.
- Maschi O., Dal Cero E., Galli G.V., Caruso D., Bosisio E., & Dell'Agli M., (2008). «Inhibition of human Camp phosphodiesterase as a mechanism of the spasmolytic effect of *Matricaria recutita* L.». *J Agric Food Chem*; 56:5015–5020.
- Mathur S., Mathur T., Srivastava R., & Rohit Khatri R., (2011). «Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control». *National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology*, 1(2):45–50.
- McKay D.L., Blumberg J.B. (2006). «A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.)». *Phytother Res*; 20:519–530.
- Ministerio de salud (2005). «Salud Bucal» 2 de abril del 2014 en: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm.
- Moraes de Souza T.L.C., Oldoni M.A.B., & Regitano d'Arce S.M., (2008). Alencar. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1):41-47.
- Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Vincieri F.F., & Prucher D., (2000). Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. *Chromatographia*, 51, 301-307.
- Muñoz E.E., Rivas K., Loarca M.G.F., Mendoza S., Reynoso R., & Ramos M., (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 3(3):481-495.
- Negrón, M. (2010). *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Práctica*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 2ª. Edición.
- Nováková L., Vildová A., Mateus J.P., Gonçalves T., & Solich P., (2010). Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. *Talanta*, 82(4): 1271–1280.
- Ocampo-Sánchez R.Á., (2000). *Manual de Cultivo y Conservación de Plantas Medicinales*. San José, Costa Rica: Tramil Centroamerica.
- Organización Mundial de la Salud (2004). «La Organización Mundial de la Salud publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales». Visita 14 de abril del 2014 en: <http://www.paho.org>.
- Organización Panamericana de la Salud (1997). «Salud Oral». 22 de mayo del 2014 en: www.paho.org/spanish/gov/cd/doc259.pdf.
- Rodríguez M.C., Da Silveria R.P., Vázquez E.M. & Calafell R.A. (2013). «Acción antimicrobiana del enjuague de *Matricaria chamomilla* en pacientes tratados ortodónticamente en una clínica de especialidad». *Medicina salud y sociedad*, 4(1):5-14.
- Sainz de Net T., & Ruiz J., (2004). «Estudio de flora bacteriana en pacientes tratados ortodónticamente, aplicando enjuagues bucales de *Matricaria chamomilla* «manzanilla». Recuperado: <http://www.odontologia-online.com/casos/part/JRC/>.
- Salamon I., (2007). Effect of the internal and external factors on yield and qualitative-quantitative characteristics of chamomile essential oil. *Acta Horti*. 749, 45–64.
- Srivastava J.K., & Gupta S., (2009). Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. *Molecular Cell Pharmacology*, 1, 138-152.
- Srivastava J.K., Shankar E., & Gupta S., (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review). *Molecular Medicine Reports*, 3, 895-901.
- Troncoso N., Sierra H., Carvaja L., Delpi P., & Günthe G., (2005). «Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in *Fresh rosemary*». *J Chromatogr R*, 1100 (1), 20-25.
- Umar J., Muni A., Hameed A., & Ahmed S., (2005). Salivary count of *Streptococcus mutans* in caries prediction. *Pakistan oral & Dent. Jr.* 25(1).

FIGURAS

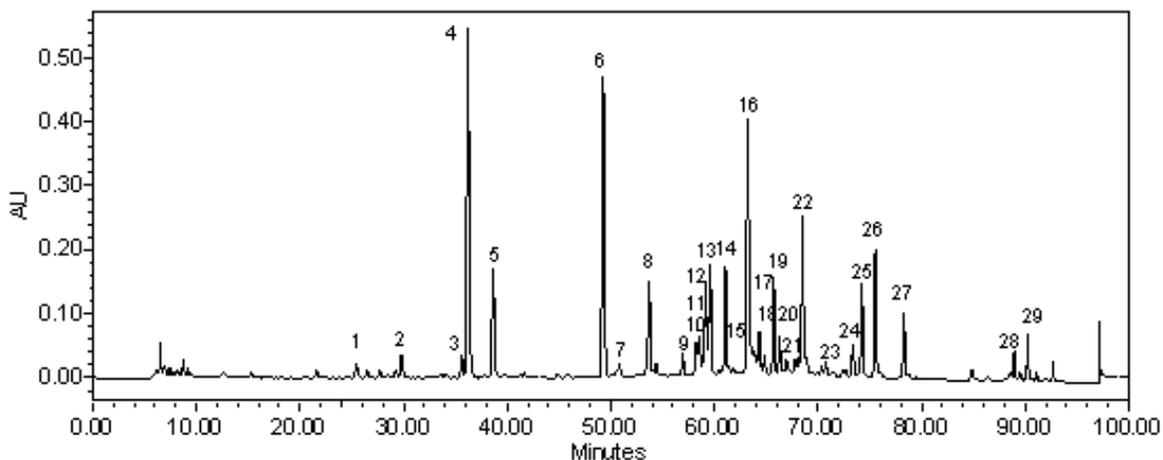


Figura 1. Cromatograma HPLC-DAD de compuestos fenólicos presentes en la infusión de manzanilla. Derivados de ácidos cinámicos: picos 1, 3, 4, 6, 7, 14, 15, 18-20, 23 ácido cafeico y picos 28 y 29 ácido *ñ*-cumarico. Derivados de flavonoides: picos 2 y 9 catequina; picos 8, 10, 12, 13, 17 y 21 quercitina, pico 11 luteolina y picos 16, 22, 24, 25-27 apigenina.

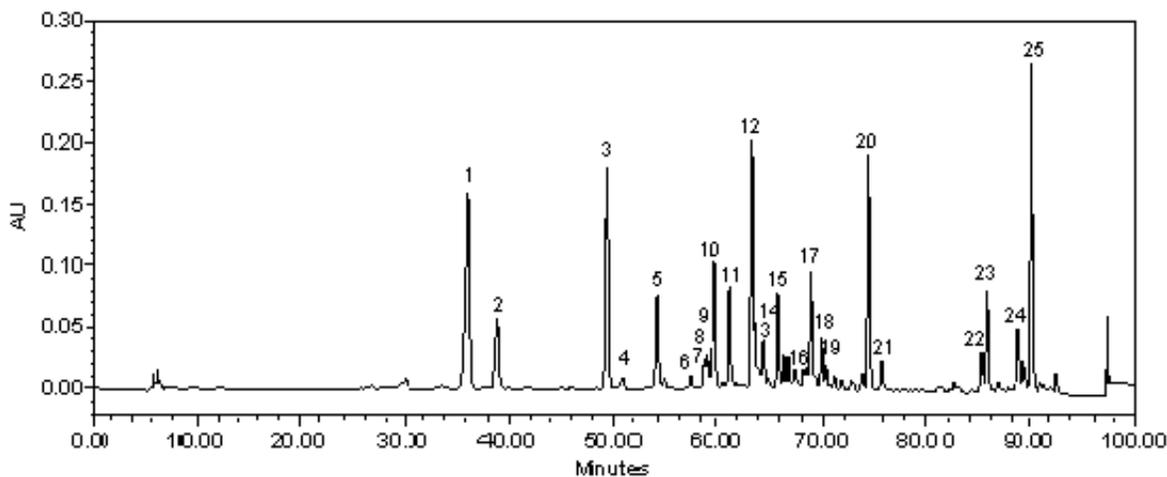


Figura 2. Cromatograma HPLC-DAD de compuestos fenólicos presentes en el extracto de manzanilla. Derivados de ácidos cinámicos: picos 1, 3, 4, 11 y 15 ácido cafeico; picos 18, 23-25 ácido *ñ*-cumarico y pico 2 ácido clorogénico. Derivados de flavonoides: pico 6 catequina; picos 5, 7, 9, 10, 13 y 14 quercitina; picos 8 y 16 luteolina y picos 12, 17, 19-21 apigenina; pico 22 erodictiol.

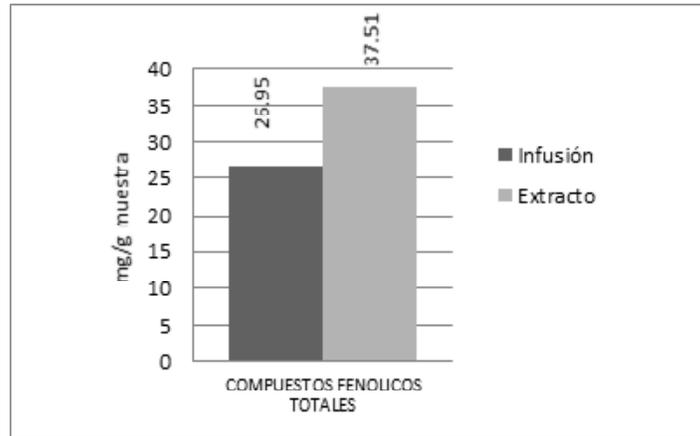


Figura 3. Concentración total de compuestos fenólicos en la infusión y en el extracto de manzanilla analizados por HPLC-DAD. La concentración de compuestos fenólicos totales no fue estadísticamente diferente entre ambos productos ($p > 0,01$).

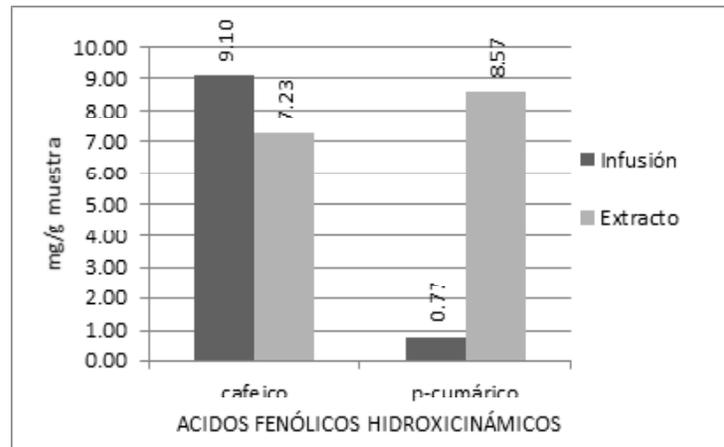


Figura 5. Concentración de derivados de ácidos fenólicos hidroxicinámicos en la infusión y en el extracto de manzanilla analizados por HPLC-DAD. La concentración de ácidos fenólicos hidroxicinámicos, p-cumárico y cafeico no fue estadísticamente diferente entre ambos productos ($p > 0,01$).

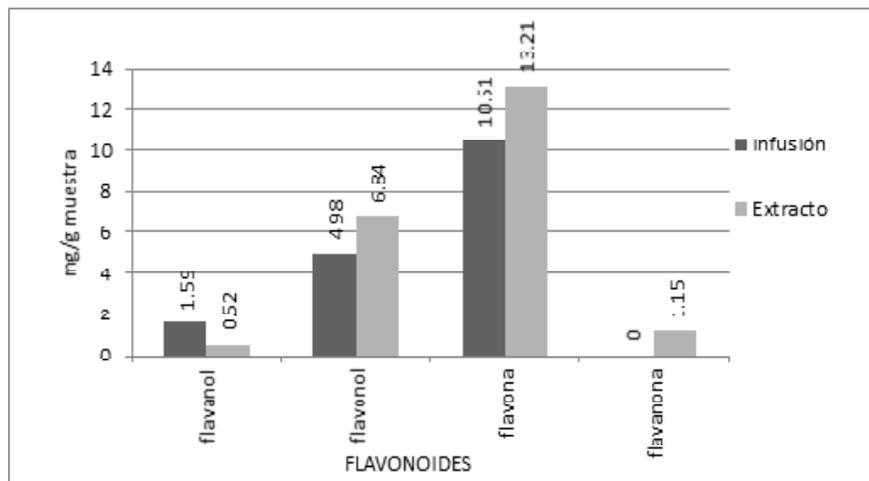


Figura 6. Concentración de derivados de flavonoides en la infusión y en el extracto de manzanilla analizados por HPLC-DAD. La concentración de flavanol, flavonol y flavona no fue estadísticamente diferente entre ambos productos. ($p > 0,01$).

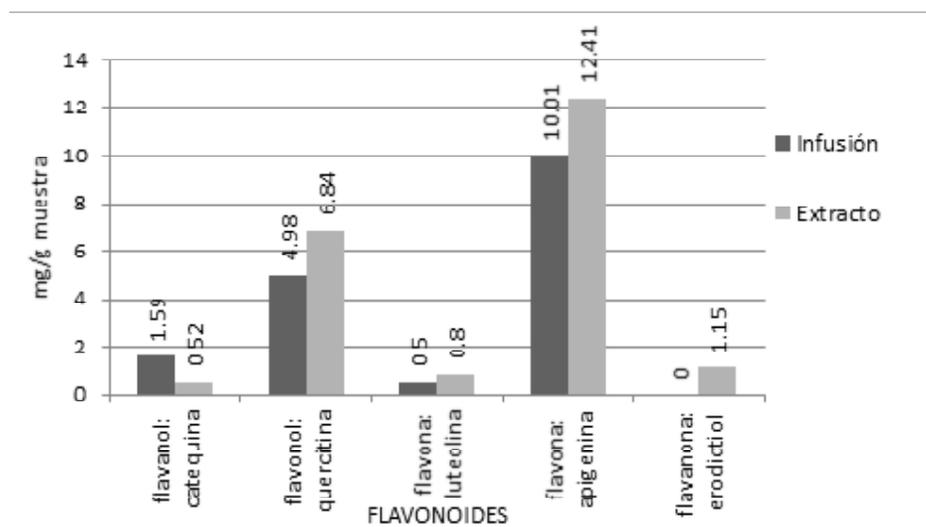


Figura 7. Concentración de derivados de flavanol, flavonol, flavona y flavanol en la infusión y en el extracto de manzanilla. analizado por HPLC-DAD. El contenido de catequina, quercitina, luteolina y apigenina no fue estadísticamente diferente entre ambos productos ($p > 0,01$)

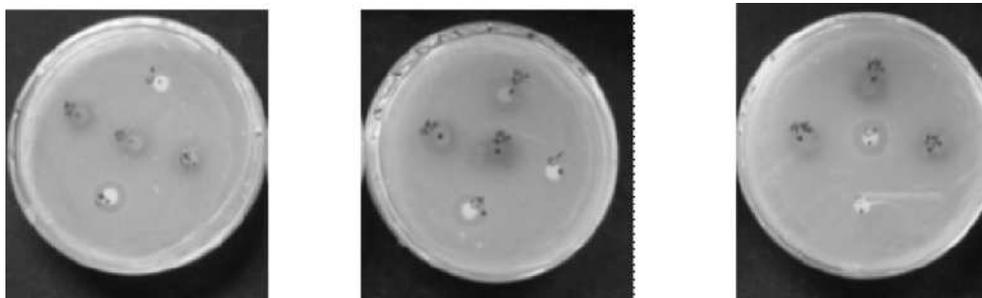


Figura 8. Halos de inhibición de los tratamientos. No se evidencia halos de inhibición en las infusiones de manzanilla al 2%, al 4% y al 8%, tampoco en el control negativo (C-) agua mineral esterilizada; si se evidencia halos de inhibición de 2.5 mm en promedio en el control positivo (C+) colutorio de clorhexidina al 0,12%

