



**UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**Tema:**

**“INHIBICIÓN DEL *S. MUTANS* CON LA ADICIÓN INDIVIDUAL DE  
*R. Ulmifolius*, *P. Mollissima* o *V. Floribundum* A LECHE DEL  
PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN ESCOLAR, MANTA 2017”**

**Autor:**

**TAGLE GONZÁLEZ RUDY GISSELLA  
e-mail: rulliztagle@gmail.com**

**Tutor:**

**STALIN SANTACRUZ TERÁN PhD.**

**MANTA – ECUADOR  
2017**

## **APROBACION DEL TRIBUNAL**

Los suscritos miembros del tribunal correspondiente, declaramos que se ha APROBADO la tesis titulada **“INHIBICIÓN DEL S. *MUTANS* CON LA ADICIÓN INDIVIDUAL DE *R. Ulmifolius*, *P. Mollissima* O *V. Floribundum* A LECHE DEL PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN ESCOLAR, MANTA 2017”**, ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Rudy Gissella Tagle González, previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA APROBACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí

---

Ing. Sabrina Trueba Macías  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Aldo Mendoza González  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Miguel Zambrano  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, Dr. Stalin Santacruz Terán, certifico haber tutelado la tesis titulada **“INHIBICIÓN DEL *S. MUTANS* CON LA ADICIÓN INDIVIDUAL DE *R. Ulmifolius*, *P. Mollissima* O *V. Floribundum* A LECHE DEL PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN ESCOLAR, MANTA 2017”**, que ha sido desarrollada por Rudy Gissella Tagle González, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA APROBACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí

---

Stalin Santacruz Terán PhD

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA**

Yo, Rudy Gissella Tagle González, declaro bajo juramento que, el trabajo aquí descrito es de mi total y absoluta autoría, que no ha sido previamente presentada por ningún grado o calificación profesional, y que se ha consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondiente a este trabajo, a la Universidad Laica Eloy Alfaro De Manabí, y a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de dicha universidad, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

**Rudy Gissella Tagle González**

## AGRADECIMIENTO

*Empiezo agradeciendo a quien ha forjado mi camino y dirigido por el sendero correcto, Dios, que en todo momento está conmigo y me permite cumplir con esta meta.*

*Así mismo al culminar mi trabajo de tesis agradezco a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, y la facultad de Ciencias Agropecuarias por darme la oportunidad de una educación superior de calidad, en la cual forjé mis conocimientos profesionales día a día;*

*Al Dr. Stalin Santacruz por su dedicación, apoyo y confianza en la realización del presente trabajo de investigación, a los demás docentes especialmente a los Ingenieros Aldo Mendoza, María Isabel, por aportar sus conocimientos y ser guías en toda la carrera universitaria.*

*A María Guadalupe mi mejor amiga, una hermana, gracias por ser parte de mi vida, por el apoyo brindado y los buenos momentos compartidos todos estos años de amistad, espero que Dios permita seguir contado con ella.*

*A Jonathan gracias por ser de las personas que ha estado incondicionalmente junto a mí, en los momentos y situaciones más difíciles, por cada palabra de aliento, siempre fuiste muy motivador y decías que lo lograría. Me has ayudado hasta donde te es posible, incluso más que eso, muchas gracias.*

*A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, mis logros se los debo a ustedes, en los que se incluye este. Me han formado con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.*

*A mi familia en general tíos, primos, y demás amigos, suponen los cimientos de mi desarrollo, todos y cada uno de ustedes, han destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, para brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida.*

GRACIAS

**Rudy T.**

## DEDICATORIA

*A Dios, por ser mi guía en esta etapa de mi vida,*

*A mis padres Johnny y Gissella, por su esfuerzo y el apoyo incondicional para alcanzar esta meta.*

*A Mis hermanas queridas Suly y Marllely, porque ellas son mi inspiración para superarme cada día.*

*A mis abuelos Isabel y Fernando, así mismo a Angelita y Bartolomé por brindarme su amor inigualable.*

*Gracias por confiar en mí, Los amo.*

**Rudy T.**

## INDICE GENERAL

APROBACION DEL TRIBUNAL	II
CERTIFICADO DEL TUTOR	III
DECLARACIÓN DE AUTORÍA	IV
AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE ANEXOS	X
RESUMEN	XI
SUMARY	XII
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. CONTEXTUALIZACIÓN	4
1.2.1. Contextualización – macro	5
1.2.2. Contextualización – meso	5
1.2.3. Contextualización – micro	5
1.3. ANÁLISIS CRÍTICO	6
1.4. DELIMITACION DEL PROBLEMA	6
1.5. OBJETIVOS	7
1.5.1. OBJETIVO GENERAL	7
1.5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
1.6. JUSTIFICACIÓN	8
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	10
2.1. CULTIVOS ANCESTRALES ANDINOS	10
3.2.1. MORA (Rubus ulmifolius)	11
3.2.2. TAXO (Passiflora tarminiana)	12
3.2.3. MORTIÑO (Vaccinium floribundum)	13
2.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	14
2.1.1. Antioxidantes:	14
2.1.2. Radicales libres:	16
2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	17
2.3. CARIES DENTALES	17
2.3.1. Streptococcus mutans	18

2.3.2. Sustrato Cariogénico .....	20
2.4. PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN ESCOLAR (PAE), .....	21
2.4.1. Refrigerio Leche Entera UHT .....	22
2.5. TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO. ....	22
CAPÍTULO III	
DISEÑO METODOLÓGICO .....	24
3.1. HIPÓTESIS .....	24
3.2. UBICACIÓN DEL PROYECTO .....	24
3.3. VARIABLES EN ESTUDIO .....	24
3.3.1. Variables Independientes .....	24
3.3.2. Variables Dependientes .....	24
3.4. FACTORES EN ESTUDIO .....	24
3.4.1. FACTOR A: Tipos de Frutas .....	24
3.4.2. FACTOR B: Concentración de extracto de fruta (% v/v) .....	25
3.5. TRATAMIENTOS .....	25
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	26
3.6.1. Tipo de diseño .....	26
3.6.2. Número de Repeticiones .....	26
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	26
3.8. METODOLOGÍA .....	26
3.8.1. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
3.8.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE TAXO, MORA Y MORTIÑO .....	27
3.8.3. ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> ..	28
3.8.4. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL MEJOR TRATAMIENTO DE LECHE SABORIZADA .....	30
CAPÍTULO IV	
DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	31
CAPÍTULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	36
5.1. CONCLUSIONES .....	36
5.2. RECOMENDACIONES .....	37
PROPUESTA .....	38
BIBLIOGRAFÍA .....	39
ANEXOS .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Características Nutricionales Leche Entera UHT</i> _____	22
Tabla 2. Combinación de los factores en estudio_____	25
Tabla 3. Análisis de varianza (ADEVA) _____	26
Tabla 4. Diluciones de extracto frutas en leche de PAE _____	28
Tabla 5 Análisis de Varianza de inhibición de S. mutans en 24 h _____	31
Tabla 6 Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del S. mutans luego de 24 horas con respecto al tipo de fruta_____	32
Tabla 7. Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del S. mutans luego de 24 horas con respecto a la concentración del extracto de fruta _____	32
Tabla 8 Análisis de Varianza de inhibición de S. mutans en 48 h _____	33
Tabla 9 Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del S. mutans en 48 horas con respecto al tipo de fruta _____	33
Tabla 10. Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del S. mutans en 48 horas con respecto a la concentración del extracto de fruta _____	34
Tabla 11. Análisis de Varianza de Evaluación sensorial de leche saborizada	35
Tabla 12 Prueba de comparación Tukey de evaluación sensorial de leche saborizada_____	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Leche entera de programa de alimentación escolar _____	46
Anexo 2. Frutas empleadas en el estudio, mortiño, taxo y mora _____	46
Anexo 3. Extracto de Frutas _____	47
Anexo 4. Preparación de las diluciones con extractos de frutas _____	47
Anexo 5 Diluciones de extracto de frutas en leche de PAE _____	48
Anexo 6 Dilución de <i>Streptococcus mutans</i> $1.5 \times 10^8$ UFC. _____	48
Anexo 7. Siembra del <i>Streptococcus mutans</i> en agar sangre _____	49
Anexo 8. Colocación del agente antimicrobiano en discos de papel filtro ____	49
Anexo 9. Colocación de discos con los agente antimicrobianos en placas con <i>Streptococcus mutans</i> _____	50
Anexo 10. Muestra Control, Leche Saborizada del PAE _____	50
Anexo 11. Incubación de las cajas petri _____	51
Anexo 12. Escala hedónica utilizada en la evaluación sensorial de los mejores tratamientos _____	52
Anexo 13. Diámetro de Halos de inhibición _____	53
Anexo 14. Halo de inhibición de los diferentes tratamientos _____	54
Anexo 15. Evaluación Sensorial _____	56

## RESUMEN

Es conocido que el consumo excesivo de azúcares conlleva al desarrollo de caries dental, obesidad, entre otras enfermedades. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de mora, taxo y mortiño en concentraciones de 1, 2, 3% frente a *Streptococcus mutans* (uno de los microorganismos responsables del desarrollo de caries dental) empleando el método de disco-difusión en agar. El efecto de la adición de fruta a leche entera que proporciona el Programa de Alimentación Escolar se evaluó mediante análisis sensorial con la adición de taxo y mortiño al 1%. Los resultados mostraron que extractos de mora, mortiño y taxo presentaron un halo de inhibición promedio a las 24 horas de 1.34, 1.42, y 1.57 cm y a las 48 horas 1.31, 1.40, 1.46 cm respectivamente. Las tres frutas mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) frente al control donde no hubo inhibición, siendo mortiño y taxo estadísticamente iguales y diferentes de mora. Los extractos con concentraciones diferentes mostraron que la concentración de 3% presentó un mayor halo de inhibición con respecto a 1 y 2%, siendo estas dos últimas estadísticamente iguales. Los resultados obtenidos en el análisis sensorial mostraron que existió diferencia estadística entre la muestra de mortiño, taxo y leche. La muestra de mayor aceptación fue mortiño con una calificación de me gusta mucho en una escala hedónica de 5 puntos, concluyendo que es la fruta recomendada para utilizar como saborizante en leche, sabiendo además que tendrá mayor inhibición frente al *S. mutans*.

**Palabras Claves:** Inhibición, *Streptococcus mutans*, actividad antibacteriana.

## SUMMARY

It is known that excessive consumption of sugars leads to the development of dental caries, obesity, among other diseases. The present study evaluated the antibacterial activity of blackberry, taxo and mortiño in concentrations of 1, 2, 3% against *Streptococcus mutans* (one of the microorganisms responsible for the development of dental caries) using the disk-diffusion method in agar. The effect of adding fruit to whole milk provided by the School Feeding Program was evaluated by sensory analysis with the addition of taxo and mortiño to 1%. The results showed that blackberry, mortiño and taxo extracts presented an average inhibition halo at 24 hours of 1.34, 1.42, and 1.57 cm and at 48 hours 1.31, 1.40, 1.46 cm respectively. The three fruits showed significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to the control where there was no inhibition, being mortiño and taxo statistically equal and different from blackberry. Extracts with different concentrations showed that the 3% concentration had a greater halo inhibition with respect to 1 and 2%, the latter two being statistically equal. The results obtained in the sensorial analysis showed that there was no statistical difference between the mortiño and milk samples, but with respect to taxo. The most accepted sample was Mortiño with a rating of I like very much in a hedonic scale of 5 points, concluding that it is the recommended fruit to use as a flavoring in milk, knowing also that it will have greater inhibition against *S. mutans*.

**Keywords:** Inhibition, *Streptococcus mutans*, antibacterial activity.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador es uno de los principales países productores de cultivos ancestrales andinos, diversidad de productos autóctonos en el mercado nacional es cada vez mayor, introduciéndose diariamente nuevos frutos de la región andina y amazónica, cuyas propiedades no están aun totalmente determinadas.

Una dieta rica en frutas y verduras se asocia con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas e infecciosas. Estas frutas contienen fibra dietética insoluble, vitamina C, E, folato, carotenoides, selenio y compuestos fenólicos (Szajdek & Borowska, 2008) (Abdel-Aal & Akhtar, 2006), que participan en la prevención de enfermedades degenerativas.

Los fenoles son parte de nuestra dieta porque se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales (Lopez, 2008), poseen gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades de carácter crónico.

La dieta no solo es importante para la salud en general sino también para la salud oral. Preexiste una estrecha relación entre la caries dental y la dieta. El consumo de azúcares simples o carbohidratos refinados, especialmente, la sacarosa o azúcar común, considerado el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque el *S. mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, desarrollando la cavidad bucal. (Nuñez & Garcia, 2010)

Esto es aplicable a cualquier etapa de la vida, en el caso de los niños, por ejemplo, la adquisición de unos hábitos alimentarios es fundamental para prevenir la aparición de caries entre otras cosas. En Ecuador niños escolares consumen leche edulcoradas con azúcar que según estudios esta influyen en la enfermedad cariogénica.

El presente estudio tiene por objetivo estudiar el poder de inhibición, a través de análisis microbiológico, de tres tipos de frutas como mora (*Rubus ulmifolius*), taxo (*Passiflora mollissima*) o mortiño (*Vaccinium floribundum*), frente al *Streptococcus mutans*, bacteria causantes de las caries dentales, enfermedad que afecta a la mayoría de la población en el Ecuador. Paralelamente se pretende utilizar extractos de las tres frutas como saborizantes en leche del PAE.

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental es uno de los padecimientos de salud más habituales en todo el mundo. Escribano y Matesanz (2005), afirman que, de las enfermedades infecciosas unas de las principales que afectan a los seres humanos son las caries dentales. A pesar de que la reducción de la incidencia y prevalencia de la caries dental en muchos países se relaciona en gran medida con el uso sistemático del flúor en las pastas dentífricas y la mejora de la higiene dental, se debe tener presente la importancia de los hábitos alimentarios en la prevención primaria y secundaria de la caries dental.

Aguilera (2011), afirma, que la enfermedad cariogénica es producida por bacterias determinadas, estipulando así dentro de los principales causantes al *Streptococcus mutans*, que produce ácidos aprovechando la presencia de carbohidratos para producir una desmineralización del esmalte.

La caries dental aun es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, incluyendo Ecuador.

Según la Organización Mundial de la Salud (2004), la población más propensa a sufrir problemas son los niños de edad escolar, entre el 60% y el 90% de este grupo se ven afectados. Los índices de CPOD (promedio de piezas definitivas cariadas, pérdidas u obturadas) en Ecuador a la edad de entre 6 y 7 años muestran un CPOD de 0,22, y pasa a 2,95 a la edad de 12 años y a 4,64 (CPOD) a la edad de 15 años (Raza, et al 2010), Esto define un nivel severo de acuerdo con lo establecido por la OMS, que reporta valores de CPOD para 12 años tal como sigue: 0,0-1,1 muy bajo; 1,2-2,6 bajo; 2,7-4,4 Moderado; 4,5-6,5 Alto; +6,6 Muy alto. (Gonzalez S, Gonzalez N, & Gonzalez N, 2013)

El índice CPOD a los 12 años es el usado para comparar el estado de salud bucal de los países, La edad de los 12 años es la elegida como referencia a nivel mundial para conocer y comparar la prevalencia de caries, edad en la que el recambio de la dentición temporal por la definitiva se ha realizado. De manera que el CPO-D para este grupo se considera como el indicador

epidemiológico que refleja mejor el estado de la salud bucal de la población infantil y adolescente. (Sánchez, Villagrán, & Vanegas, 2002)

Nuestra dieta desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la caries dental. Muchos estudios epidemiológicos correlacionan el consumo de azúcar con la prevalencia de caries y en los que se demuestra una clara asociación entre frecuencia de consumo, la ingesta entre comidas y el desarrollo de caries dental. Por otra parte, varias características de los alimentos pueden influir en el potencial cariogénico de estos, como por ejemplo concentración de sacarosa, consistencia, aclaración oral, combinación de alimentos, secuencia y frecuencia de ingestión y pH de los alimentos (Gonzalez *et al*, 2013).

En consecuencia la caries dental en niños escolares se debe a una combinación de múltiples factores, el tipo de alimentos consumidos así como la frecuencia de la exposición de estos alimentos para las bacterias cariogénica, y los dientes sensibles.

Gonzalez *et al*. (2013), indica que, el riesgo de desarrollar caries dental es mayor si los azúcares son consumidos muy frecuentemente y están en una forma de presentación tal que el alimento queda en la boca durante períodos largos. El consumo frecuente y elevado de bebidas edulcoradas con azúcar y una falta de cepillado dental normal son considerados factores principales en el desarrollo de caries dental, Son de los más cariogénicos, alimentos que contienen entre un 15 y un 20% de azúcares, especialmente sacarosa; es el azúcar más cariogénico, ya que puede formar glucano, una sustancia que permite una mayor adherencia bacteriana a los dientes y condiciona la difusión de ácido y los buffers en la placa.

## **1.2. CONTEXTUALIZACIÓN**

La caries dental es una enfermedad que afectan a nuestra sociedad en unos niveles altos, es un problema de salud crónico que comienza frecuentemente durante la niñez y adolescencia y a menudo tiene secuelas para toda la vida.

### **1.2.1. Contextualización – macro**

A nivel mundial esta es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes, están relacionadas con el consumo de azúcares. Según la Organización Mundial de la Salud (2004), la población más propensa a sufrir problemas son los niños de edad escolar, entre el 60% y el 90% de este grupo se ven afectados. En América latina se observa, desde la década de los setenta, la ejecución de programas de prevención y promoción y salud bucal con el fin de lograr la disminución de la enfermedad de caries.

### **1.2.2. Contextualización – meso**

Un estudio epidemiológico nacional de salud bucal en Ecuador durante el año 2009 presenta que un 14,8% de niños con problemas de caries presentan dolor e infección en las piezas dentales, lo que obliga a pensar en una atención de salud preventiva, de forma estandarizada en la población escolar del país (Raza, *et al*, 2010)

### **1.2.3. Contextualización – micro**

Hoy en día los niños asisten a muy temprana edad a centros preescolares, lo que algunas veces causa desordenes en los hábitos alimentarios. La modificación de la dieta también puede ser una estrategia efectiva para prevenir caries como cambiar del azúcar natural a edulcorantes artificiales, son las estrategias que tienen más probabilidades de ser exitosas. (Cid, Martínez, & Morales, 2008)

Según (Lara & San Andres, 2009) estudio realizado en la Escuela Andrés de Vera de la ciudad de Portoviejo se evidencian problemas que afectan la integridad de la estructura dentaria, especialmente en los niños de edad preescolar. Debido a la gran variedad de alimentos industrializados disponible en el comercio, ya sean forma de bebidas lácteas y postres son pocos

consistentes y no estimulan la masticación y la secreción salival, importante para la aparición de caries dental.

### **1.3. ANÁLISIS CRÍTICO**

Las caries dentales es un problema de salud pública, afectando en gran manera a la población infantil, los niños son los más vulnerables al desarrollo de la caries, por diferentes causas, siendo una de las principales el consumo excesivo de alimentos azucarados. A este respecto, hay suficientes evidencias que comprueban de que el consumo de los azúcares facilitan las condiciones fisicoquímicas que dañan la superficie de los dientes, en sentido opuesto, cuando se restringen el consumo de estos hidratos de carbono, alimentos entre comidas, y las bebidas azucaradas se previene la caries. (Cid, Martínez, & Morales, 2008)

Teniendo en cuenta que la dieta es una de las pocas variables etiológicas de la caries dental que podemos modificar, la adecuación u orientación de hábitos alimenticios correctos, representa una contribución para la salud bucal. Siendo una alternativa el uso de edulcorantes naturales como remplazo de azúcares.

### **1.4. DELIMITACION DEL PROBLEMA**

El presente trabajo de investigación, se realizó dentro de la provincia de Manabí, se empleó materia prima frutas como mora y taxo adquiridos en el mercado central de la ciudad de Manta, al igual que mortiño proveniente de la ciudad de Quito, la parte experimental se desarrolló dentro de las instalaciones la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí de la ciudad de Manta, se estudiara información sobre los compuestos fenólicos presentes en las frutas y sus efectos frente a la inhibición del *streptococcus mutans*, Así mismo se estudiara el mejor tratamiento para emplear como saborizante para leche en base a los resultados microbiológicos.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. OBJETIVO GENERAL**

Inhibir el desarrollo de *Streptococcus mutans* con la adición individual de mora (*Rubus ulmifolius*), taxo (*Passiflora mollissima*) o mortiño (*Vaccinium floribundum*), a leche del PAE.

### **1.5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar mediante análisis microbiológico la fruta que tiene mayor poder de inhibir el desarrollo de *Streptococcus mutans*.
- Determinar mediante análisis microbiológico la concentración de fruta con mayor inhibición sobre *Streptococcus mutans*.
- Efectuar una prueba de aceptación a la mezcla fruta-leche correspondiente al mejor tratamiento del estudio.

## 1.6. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, por lo que la obtención y preparación de productos con alto contenido de estos compuestos suponen una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes (Porrás & Lopez, 2009). Actualmente hay un interés creciente en su consumo debido a su capacidad antioxidante.

Vasco (2009), demuestra que frutas cultivadas en el Ecuador poseen un alto contenido de compuestos fenólicos, tal es el caso de la mora (*Rubus ulmifolius*), taxo (*Passiflora mollissima*) o mortiño (*Vaccinium floribundum*), Estas frutas están disponibles en el mercado ecuatoriano, pero debido a una falta de conocimiento actual su consumo es relativamente bajo, tanto como fruta así como en el desarrollo de productos de valor agregado, desaprovechando así sus beneficios medicinales.

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son el motivo de sus posibles implicaciones en la salud humana, como son la prevención del cáncer, disminución en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas. (Zamora, 2007)

Los compuestos fenólicos son importantes para la fisiología de las plantas, Su morfología (es decir, color y soporte mecánico en el caso de la lignina), Crecimiento (los ácidos fenólicos se han relacionado con la absorción de nutrientes, Síntesis, actividad enzimática, fotosíntesis, etc.), reproducción (atracción de aves e insectos que ayudan con la polinización) y en la protección contra el ataque por patógenos, herbívoros y otros factores de estrés. (Vasco C. , 2009)

Actualmente Ecuador posee un Programa de Alimentación Escolar (PAE), Su oferta de alimentos es través del desayuno (Galleta Rellena o Tradicional, Granola y Barra de Cereales) y del refrigerio escolar (Leche UHT sabores o entera). Refrigerio para la educación inicial y educación básica que consiste en

200 ml de leche líquida edulcorada, con sabores artificiales, en envase tetra brik, lista para el consumo de los escolares. (PAE, 2017)

Estos productos poseen altos contenidos de grasa y azúcar, lo que genera conflicto en relación a las reglamentaciones estipuladas por el Acuerdo Interministerial 005/2014, en el que es prohibida la venta de productos que contengan alto nivel de azúcares totales (igual o mayor a 15 gramos en 100 gramos) en los bares escolares; mientras alimentos similares son ofrecidos en la alimentación escolar. (Ministerio de Salud Pública, 2015)

La OMS recomienda una ingesta diaria de 50g de azúcares en niños y 25g si se desea obtener beneficios adicionales. (Organización Mundial de la Salud, 2015) En su información nutricional la leche brindada por el PAE describe 14g de azúcar por cada 200 g de bebida, (PAE, 2017). De acuerdo a este último valor no existe problema en el contenido de azúcar, sin embargo hay que considerar el consumo de los demás productos entregados por el PAE en el desayuno y refrigerio escolar.

El azúcar total consumida por un niño con la alimentación escolar será de 24 gramos (Barra de Cereales 2.5g, galletas 7g, leche saborizada 14g), favoreciendo al desarrollo de caries dentales, tal y como demuestran estudios en que se presenta la asociación entre caries y carbohidratos refinados, especialmente, la sacarosa o azúcar común ya que los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microflora bucal y dan inicio al proceso de cariogénesis sobre todo si estos son consumidos entre comidas. (Duque de Estrada, Pérez, & Hidalgo, 2006) (Cid et al, 2008).

En base a la información previa la presente investigación plantea la adición de extractos de frutas (mora, taxo y mortiño) en un alimento del PAE para inhibir el desarrollo de *Streptococcus mutans* causante de las caries dental

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. CULTIVOS ANCESTRALES ANDINOS**

Ecuador produce una gran variedad de cultivos hortofrutícolas, esto se da gracias a la posición geográfica en el que se encuentra ubicado y a la existencia de microclimas que hacen que nuestra producción sea de excelente calidad. Existe una amplia gama de deliciosas frutas de origen tropical, sub tropical y de áreas andinas, que están llegando a los mercados internacionales, así mismo existen frutas que no se conocen fuera de los mercados locales, a pesar de su alto potencial de exportación, y de las cuales solo se lleva a cabo un procesamiento limitado para la obtención de ciertos productos alimenticios.

La agricultura andina tradicional está guiada por un conocimiento técnico, el cual se manifiesta en una serie de prácticas de la producción y conservación que puede servir de base para el desarrollo de una estrategia agroecológica de desarrollo en los ámbitos económico, social, ecológico, nutricional y funcional en nuestro país y en el resto de países atravesados por la cordillera de los Andes. (Peralta, 2006).

Los cultivos andinos son parte de las variedades trabajadas ancestralmente por las sociedades prehispánicas constituyendo un verdadero repositorio de material filogenético de importancia única y trascendental, Al mismo tiempo, se trata de cultivos de alto valor nutricional, cuyas características los hacen adecuados para los consumos dietéticos. A lo largo de los años fueron desplazados por otros cultivos y su propio consumo fue culturalmente postergado. Hoy son cultivos complementarios en las economías familiares pobres y generalmente producidas sin insecticidas y fertilizantes químicos. (Peralta, 2006)

### 3.2.1. MORA (*Rubus ulmifolius*)

La mora (familia Rosaceae, género *Rubus*), una fruta originaria de las tierras altas de América del Sur principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador, ha sido cultivada por los antepasados durante siglos y usada en costumbres alimenticias y medicinales, rica en vitaminas y minerales y con un alto contenido de agua, ligeramente dulce y de muy buen sabor. En la actualidad, su consumo es parte de la cultura gastronómica mundial, considerada una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como en el internacional. (MAGAP, 2013).

Pequeños porcentajes de mora son consumidas en estado fresco, la mayoría son utilizadas para la industria, es así que en la agroindustria de nuestro país se ofrecen diferentes opciones como: pulpa, mermeladas, jaleas, vinos y lácteos (helados, malteadas), la mora también tiene diversos usos en el plano medicinal. (Lohachoompol, Szrednicki, & Craske, 2004)

Es una fruta muy rica en compuestos fitoquímicos, especialmente en polifenoles, como ácidos fenólicos y flavonoides (Memon et al, 2010) (Sanchez-Salcedo et al, 2015) al igual que posee un alto contenido de antocianinas y carotenoides, que son antioxidantes, los cuales neutralizan la acción de los radicales libres que son nocivos para el organismo, con lo cual se producen efectos antiinflamatorios y acción antibacteriana. (MAG, 2015)

Estudios realizados con extractos de mora, presentan mayor capacidad antioxidante que las del BHT y del  $\alpha$ -tocoferol, antioxidantes utilizados en las industrias de alimentos y cosméticos. El mayor contenido de compuestos fenólicos,  $30 \pm 1$  mg Acido gálico/g, y el mayor valor de capacidad antioxidante,  $273 \pm 6$  mmol Trolox/g (Rojas et al, 2014)

Ha sido utilizada desde la antigüedad en la medicina tradicional china para tratar la fiebre mejorar la vista fortalecer las articulaciones como diuretico para proteger el hígado y disminuir la presión sanguínea hipoglucémica, hipolipidémica y antiaterogénica. Chung, Kim, & Kwon (2013), agregan que la

ingesta de estas sustancias potencia nuestro sistema inmunológico y contribuye a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso del cáncer.

### **3.2.2. TAXO (*Passiflora tarminiana*)**

Así mismo otra fruta cultivada en el Ecuador es el taxo, según INIAO (2008), el taxo es originario de Sudamérica típica de las serranías. En Ecuador, el taxo se cultiva en la serranía, especialmente en Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Azuay, Cañar y Loja, se distinguen dos tipos de taxo: el de castilla el que posee un color amarillo pálido y el amarillo o poro poro. El requerimiento del cultivo del taxo es típico del clima frío, prevalece entre los 1800 y 3000msnm, con temperaturas que van desde los 12 a 20°C.

Considerada la “Flor de Quito”, Cultivada en los pueblos indígenas, beben Infusion de la planta para evitar espontáneos. Las hojas de la planta se usan también para combatir golpes e hinchazones en la piel. En cambio, los habitantes de la provincia de Imbabura emplean la flor machacada en infusión para blanquear la cara y curar el espanto, las cualidades curativas que posee el taxo, permiten al Ministerio de Cultura y Patrimonio dinamizar y potenciar el consumo de éste producto nacional.

Es una de las especias de frutas más importante en el Ecuador por su sabor agradable y su diversidad de aplicaciones. La fruta es consumida de varias formas ya que por su exquisito sabor hace que sea muy aceptada en el medio: jaleas, mermeladas, jugos, helados, lácteos, vinos, entre otros. (Cruz, 2000)

Jimenez (2010), afirma que esta fruta tiene una gran riqueza en minerales (calcio, fosforo, hierro) y vitaminas (vitaminas A, B1, B2, B3 y C), además su proporción de azúcar es relativamente baja, solo contiene un 6%. El taxo según estudios preliminares tiene propiedades como algunos efectos depresores sobre el sistema nervioso central y podría actuar como sedante, tranquilizante, calmante y contra el insomnio.

Vasco C. (2009) expresa resultados del contenido de compuestos fenolicos en taxo es 1010 mg ácido gálico/100 g fruta fresca. Así mismo una capacidad antioxidante de 102  $\mu$ mol Trolox / g muestra fruta fresca. El taxo presenta un contenido de compuestos fenólico total más bajo pero la actividad antioxidante más alta. En su perfil fenólico mostro que tiene grandes cantidades de Flavan-3-ol y proantocianidinas, es muy rico en ácidos dimétricos y trimétricos.

### **3.2.3. MORTIÑO (*Vaccinium floribundum*)**

El mortiño, de la familia Ericaceae, llamado también uva de monte, es una fruta nativa de los páramos ecuatorianos, crece de manera silvestre en los páramos del norte de la sierra andina, que en un amplio rango altitudinal desde los 1600 hasta los 3800 msnm; se desarrolla en climas templados y fríos, con temperaturas de 8 a 16° C, (Loján, 2003)

En páramos ecuatorianos es considerada endémica y ha sido utilizada por sus habitantes desde tiempos inmemoriales principalmente en el Día de los Difuntos para la elaboración de la tradicional colada morada. En la actualidad aunque es poco común se lo emplea para consumo fresco así como en jugos, mermeladas y dulces. Sus frutos tienen contenidos importantes de azúcares, minerales, antioxidantes, vitaminas del complejo B, C y minerales como potasio, calcio, y fósforo (Morales, 2011).

En décadas anteriores este producto tenía importancia dentro de la alimentación ecuatoriana y era de fácil adquisición en los campos de la Sierra, pero con el pasar de los años su consumo ha disminuido y la planta también ha comenzado a desaparecer, debido al limitado conocimiento acerca de sus beneficios y la dificultad para su propagación.

Debido a su gran sabor, propiedades y cualidades nutricionales, estas bayas son un producto que cada vez es más consumido el mundo. Al tener un bajo contenido de calorías es favorable para su uso en dietas y además, por la presencia de compuestos fenólicos y fibra, (Vasco et al, 2009)

De acuerdo a la clasificación de frutos ecuatorianos que reporta Vasco C (2009) en función del contenido de compuestos fenólicos al fruto de mortiño se lo catalogaría como un fruto de alto contenido estos presentado valores de totales de 18 mg / 100 g fruta fresca.

Así mismo Vasco C (2009), menciona que este fruto al ser de color negro evidencia la alta concentración de antocianidinas como polifenoles, se caracterizó y se encontró que el perfil fenólico era rico en glicósidos (flavonoides) de quercetina, Ácidos hidroxicinámico y antocianinas. El perfil de la antocianina solamente contenía cianidina y glucósidos, que evidencian una capacidad antioxidante de 48  $\mu$ mol Trolox/100g de fruta fresca.

Análisis bromatológicos realizados en el Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP y análisis desarrollados por la FDA se determinó que el mortiño por su alto contenido de vitamina C (106,1mg/100 g) y la presencia de antocianinas (5%), es un indicador de su funcionalidad como antioxidante celular. Por su sabor agradable y cítrico fue un fruto muy apetecido en la dieta de nuestras etnias, los registros de etnomedicina resaltan su importancia medicinal por sus propiedades curativas a nivel del sistema gastrointestinal y sanguíneo. (Coba et al, 2012)

## **2.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Es el mecanismo de acción que poseen las sustancias antioxidantes ante la presencia de radicales libres y tienen la capacidad de impedir la degradación oxidativa (Londoño, 2012)

### **2.1.1. Antioxidantes:**

Son Sustancias químicas que se encuentran en los alimentos, se caracterizan por disminuir los efectos contraproducentes de especies reactivas como las del oxígeno y nitrógeno que se producen en varias sustancias especialmente en los ácidos grasos. Dichos procesos se originan en los alimentos y también en el

organismo humano, donde se pueden producir alteraciones fisiológicas. (Leon, 2016)

Estos compuestos que retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de las reacciones oxidantes en cadena; los antioxidantes naturales constituyen una amplia gama de sustancias que incluyen los compuestos fenólicos, nitrogenados y carotenoides, ácido ascórbico. Actúan sobre los radicales libres, en diferentes procesos de la oxidación de las células (Patthamakanokporn et al, 2008)

La principal función de los antioxidantes es ayudar a la protección del organismo de los daños causados por las especies reactivas del oxígeno. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres. Los antioxidantes naturales se encuentran en vegetales y en animales, los cuales han sido utilizados en la prevención de ciertas enfermedades como el cáncer, padecimientos del corazón y la degeneración macular relacionada con la edad. Demostraciones científicas explican que estas sustancias sirven de protección a macromoléculas biológicas para prevenir el daño oxidativo (Carranco, Calvo, & Pérez, 2011)

- **Los Carotenoides**

Son pigmentos orgánicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las estructuras de plantas, animales, algas, hongos y bacterias; El cromóforo es el responsable de la capacidad de los carotenos de absorber la luz en la región del visible y por ende conferir a frutos y verduras colores amarillos, anaranjados y rojizos; la concentración de carotenos tiende a aumentar en las frutas durante el proceso de maduración. (Márquez & García, 2007) (Meléndez-Martínez et al, 2007)

- **B-caroteno**

Es un pigmento natural liposoluble que se encuentra principalmente en frutas, cereales, aceites y verduras, es el más abundante en los alimentos, confiere

colores naranjas o amarillos y pertenece al grupo de los carotenos (Engel, 2009)

Según estudios realizados se pudo determinar que el taxo contiene mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno  $306 \pm 282 \mu\text{g}/100\text{g}$  fruta fresca, en comparación con otras dos familias de Passifloras. (Vasco C. , 2009)

El color se presenta como un factor determinante para la evaluación instantánea de los carotenoides, en productos tales como: tomates, zumo de naranja y albaricoques, convirtiéndose en un instrumento útil dentro del control calidad en la industria alimenticia (Meléndez-Martínez et al, 2007)

- **Las Antocianinas**

Son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que dan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutas con excepción de algunos frutos en los cuales su pigmentación rojiza se debe a carotenoides (Wong D, 1995)

Constituyen el mayor grupo de compuestos fenólicos presentes en bayas como: *Vaccinium spp*, *Rubus spp*, *ribes*, *rubrum*, entre otras (Roldan, 2012)

Las antocianinas presentan una fuerte actividad antioxidante que ejerce su acción contra los radicales libres y también presenta un efecto de inhibición, frente a las enzimas oxidativas (Zamora J, 2007)

### **2.1.2. Radicales libres:**

Son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica; tienen capacidad de combinarse con biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un gran daño en ellas y membranas celulares. (Avello & Suwalsy, 2006)

## **2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Junto con las vitaminas, los compuestos fenólicos se consideran importantes antioxidantes en la dieta, por ejemplo, se encuentran presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales.

Según Peñarrieta et al, (2014) Miles de compuestos fenólicos se encuentran en las plantas, y se clasifican en diferentes tipos de grupos funcionales. Los compuestos fenólicos juegan una serie de funciones metabólicas en las plantas, en el crecimiento y reproducción, y en la protección contra patógenos externos y el estrés, como la radiación UV y los depredadores. Ellos son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos, por ejemplo, la astringencia de frutas y hortalizas.

Los compuestos polifenólicos se agrupan de acuerdo a su estructura química en tres grupos principales: ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides. Los 12 flavonoides son el grupo más común con más de 4000 compuestos identificados; estos se dividen en dos grandes grupos: antocianinas y antoxantinas (Schieber et al, 2001)

La placenta de taxo es rica en polifenoles, tales como: taninos, flavonoides y ácidos fenólicos; estos compuestos tienen actividad antioxidante, cuyo mecanismo sirve para atrapar los radicales libres provocados principalmente por el oxígeno (Rojano, Acosta, & Cortes, 2012)

## **2.3. CARIES DENTALES**

Las enfermedades bucales como las caries dentales cuentan con la alta prevalencia en el mundo entero (afectan del 95% al 99% de la población), lo que las sitúa como la principal causa de pérdida de dientes. La caries dental es una patología de alto costo tanto, para el individuo como para la sociedad. (Sánchez et al, 2002)

Las caries dentales por definición de la OMS (2004), es “un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y evoluciona hasta la formación de una cavidad”.

Esta enfermedad actúa específicamente desmineralizando el esmalte y la dentina. Este proceso de desmineralización es causado por diversos factores correlacionados. Los principales agentes causantes de la enfermedad son: la bacteria *Streptococcus mutans* y la ingesta descontrolada de carbohidratos refinados, como el azúcar y el biofilm dental. (Ministerio de Salud Pública, 2015)

Las caries dental se manifiesta en función de la acción simultánea de tres factores principales de acuerdo con (Hurtate, 1996) en su investigación estos son: microflora, huésped y sustrato (dieta). Al ser la etiología de la caries de naturaleza multifactorial, su tratamiento requiere la implementación de estrategias tanto de educación para la higiene bucal, combatir el agente microbiano, como orientación nutricional en busca de su disminución como enfermedad.

Según Ketterl (1994) la ingesta elevada de azúcares en la dieta, provocara un excesivo crecimiento bacteriano, así como, una hiperactividad metabólica de dichas bacterias que consecuentemente darán lugar a la desmineralización cariogénica de las piezas dentarias, estos microorganismos pueden crecer en superficies dentarias, formar ácidos y sintetizar polisacáridos a partir de los azúcares, así como, tolerar elevadas concentraciones de ácidos; casi todas las especies de microorganismos encontrados en la cavidad oral del ser humano reúnen una o más de estas características.

### **2.3.1. Streptococcus mutans**

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa

bacteriana o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. Es acidófilo, porque vive en medio con pH bajo; acidogénico, por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico, por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de los dientes) e intracelulares (metabolismo energético). (Ministerio de Salud Pública, 2015)

Entre los factores de patogenicidad presentes en *Streptococcus mutans* destacan:

- Poder acidogénico, acidófilo y acidúrico
- Síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles.
- Síntesis de polisacáridos intracelulares.
- Capacidad adhesiva por las proteínas salivales, que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, capacidad agregativa y coagregativa a través de mútanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos.
- Producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos. La habilidad del *Streptococcus mutans* de sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa de la dieta a través de la glucosiltransferasas, facilita la formación de la biopelícula dental.

El *Streptococcus mutans* usa la sacarosa para sintetizar glucanos unidos por enlaces (insoluble, base de la placa bacteriana) y (solubles, base de azúcar libre para el mantenimiento de los microorganismos que están en la película), a través de la acción de tres glucosiltransferasas secretadas que son codificadas por tres genes. Se cree que el principal papel de estos glucanos es facilitar la acumulación de estos microorganismos y establecer una matriz extracelular de polisacáridos, la cual le da a los microorganismos resistencia contra las fuerzas mecánicas normales de limpieza. (Castro, 2005)

De acuerdo a Aguilera (2011) el principal hospedador del *S. mutans* es la boca del hombre, puede desarrollarse en temperaturas que van desde 18 a 40 °C. Coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento); se han obtenido también aislamientos a partir de heces humanas. El *S. mutans* induce lesiones cariosas tanto de superficies lisas, de fosas y fisuras, como en zonas interproximales y cemento radicular.

### 2.3.2. Sustrato Cariogénico

Existe una estrecha relación entre el consumo de azúcar y la formación de caries. Ciertas características de los alimentos azucarados (consistencia, textura, adhesión) y las condiciones en las cuales son ingeridos, son más importantes como determinantes de su potencial cariogénico que la cantidad de azúcar que ellos contengan. (Duque de Estrada, Pérez, & Hidalgo, 2006). Los factores que establecen la cariogenicidad potencial de los alimentos azucarados son:

- **La consistencia física de la dieta:** los alimentos adhesivos son mucho más cariogénicos que los no retentivos. Por ejemplo, una bebida azucarada (tomada rápidamente, no a traguitos) es menos cariogénica que lo que es una confitura o un dulce, independientemente de la cantidad de azúcar que ellos contengan. (Nuñez & Garcia, 2010)
- **Momento de la ingestión:** los alimentos azucarados son más peligrosos si son consumidos entre comidas que durante ellas (postres, golosinas, etc.) Esto tiene que ver con los mecanismos de defensa naturales de la boca, que funcionan al máximo durante las comidas y tienden a eliminar los restos de alimentos que quedan en ella y a neutralizar los ácidos (capacidad *buffer*) que puedan haberse formado. Por esta razón, acaso el peor momento para ingerir un alimento cariogénico sea inmediatamente antes de ir a acostarse, porque la boca se halla casi en reposo completo durante el sueño. (Vignarajah, 1997)

- **La frecuencia:** tras la ingestión de azúcar se produce a los pocos minutos una reducción del pH de la placa dental que facilita la desmineralización del diente y favorece la caries, por lo que cuanto más frecuentes sean, más cariogénicos se vuelven (Jensen, 1999).

Dentro de los hidratos de carbono, la sacarosa es el de mayor capacidad cariogénica. Se plantea que causa aproximadamente 5 veces más caries que el almidón y que favorece el desenvolvimiento de caries de superficies lisas. Se ha planteado que uno de los factores más importantes en la prevención de la caries es hacer una dieta adecuada.

## **2.4. PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN ESCOLAR (PAE),**

Desde 1999 el Ministerio de Educación a través del Programa de Alimentación Escolar (PAE) atiende a los niños y niñas que asisten a establecimientos de educación básica fiscales, fiscomisionales, municipales y comunitarios de las cuatro regiones del país.

Este tiene como objetivo, contribuir al mejoramiento de la calidad y eficiencia de la educación básica mediante la entrega de un complemento alimenticio, principalmente en zonas con mayor incidencia de la pobreza. El Gobierno del Ecuador financia totalmente el Programa, ejecutado por el Ministerio de Educación, por intermedio del Programa de Alimentación Escolar. (Schneider & Krause, 2014)

Los productos alimenticios que ofrece son: barra de cereales, colada de frejol (harina), colada de quinua (harina), galleta rellena, galleta tradicional, granola, leche con quinua, leche UHT entera , leche UHT sabores (Instituto De Provisión De Alimentos, 2014).

### 2.4.1. Refrigerio Leche Entera UHT

El refrigerio escolar se entrega a escuelas de sectores rurales y urbano-marginales, el Ministerio de Educación entrega un refrigerio que consiste en leche entera y con saborizantes adiciona con vitaminas y minerales en una presentación de 200 ml, sus características nutricionales son las siguientes:

**Tabla 1 Características Nutricionales Leche Entera UHT**

Leche Entera UHT	
Energía	110 kcal
Grasa total	6 g
Grasa saturada	4 g
Colesterol	21 mg
Sodio	130 mg
Carbohidratos totales	8 g
Fibra total	0 g
Azúcares	8 g
Proteínas	6 g
Vitamina A	30%
Vitamina D	50%
Ácido Fólico	50%
Hierro	40%
Calcio	30%
Zinc	25%

Fuente: PAE 2017

### 2.5. TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

Los agentes antimicrobianos y el tratamiento de las enfermedades infecciosas, están cambiando continuamente, con el avance de la ciencia nuevos agentes están siendo producidos y probados constantemente para uso humano, al mismo tiempo muchas especies bacterianas son cada vez menos sensibles a dichos agentes.

Los métodos para determinar sensibilidad y resistencia en las bacterias pueden ser cuantitativos o cualitativos. Los métodos cuantitativos determinan la menor

concentración de un antibiótico capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Los métodos cualitativos son aquellos que, empleando la difusión de un antimicrobiano específico concentrado en un disco de papel, permiten categorizar a los microorganismos en sensibles, intermedios o resistentes (Galas et al, 2003)

De acuerdo a Cona (2002) la sensibilidad *in vitro* de las bacterias a agentes antimicrobianos expresada como CIM, se puede ensayar mediante varios métodos. Uno de ellos es la *Técnica de Dilución en Agar*, método ampliamente validado para diferenciar la actividad antibacteriana entre distintos materiales; Esta técnica se basa en la preparación de una serie de placas de agar a las cuales se agrega el antimicrobiano a probar en distintas concentraciones incluidas en el medio.

Luego cada una de dichas placas se inocula con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (McFarland 0.5). Las placas se examinan después de incubar por 18-24 horas a 35°C se observa si hubo crecimiento bacteriano o ausencia de él y se determina la CIM del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. Este método ha sido descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) (Cona, 2002)

El medio de cultivo estándar en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de difusión o microdilución en agar es el caldo Cerebro- Corazón (BHI), especificado en varios procedimientos estándares para la industria alimenticia y el análisis de aguas. Recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997), para preparar el inóculo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

El medio de cultivo BHI, se trata de un medio sólido, con pH ligeramente básico (7,4 +/- 0,2 a 25°C), rico en nutrientes, apto para el cultivo de muchas cepas de bacterias, hongos o levaduras. Su origen animal a base de corazón y cerebro de ganado vacuno le provee de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. (Cona, 2002)

## **CAPÍTULO III**

### **DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

La actividad del *Streptococcus mutans* es inhibida por la presencia de compuestos fenólicos provenientes de mora, taxo o mortiño.

#### **3.2. UBICACIÓN DEL PROYECTO**

El presente estudio se realizó entre el primer periodo del año 2017, en los laboratorios de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Ubicados en la ciudad de manta a 0°57'35", de latitud Sur y 80°40° al Oeste y posee una latitud de 6 metros sobre el nivel del mar.

#### **3.3. VARIABLES EN ESTUDIO**

##### **3.3.1. Variables Independientes**

- Fuente botánica de la fruta
- Concentración de extracto de fruta (Extracto añadido a leche entera UHT) (% v/v)

##### **3.3.2. Variables Dependientes**

- Inhibición *in vitro* de *Streptococcus mutans*

#### **3.4. FACTORES EN ESTUDIO**

##### **3.4.1. FACTOR A: Tipos de Frutas**

**Niveles en estudio:**

- **A1:** Mora
- **A2:** Mortiño
- **A3:** Taxo

### 3.4.2. FACTOR B: Concentración de extracto de fruta (% v/v)

Niveles en estudio:

- **B1:** 1%
- **B2:** 2%
- **B3:** 3%

### 3.5. TRATAMIENTOS

En la siguiente tabla se presentan la combinación de los factores de estudio; tipos de fruta (mora, taxo y mortiño) y porcentaje añadido al alimento (1, 2, 3%

**Tabla 2. Combinación de los factores en estudio**

TRATAMIENTOS	TIPOS DE FRUTAS	Concentración de extracto de fruta
T1	Mora	1%
T2	Mora	2%
T3	Mora	3%
T4	Mortiño	1%
T5	Mortiño	2%
T6	Mortiño	3%
T7	Taxo	1%
T8	Taxo	2%
T9	Taxo	3%
<b>CONTROL</b>	Leche entera UHT	

**Autor: Tagle, R (2017)**

### **3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.6.1. Tipo de diseño**

En la investigación se utilizó un diseño de Arreglo Bifactorial (3x3+1), en Diseño Completamente al Azar (DCA)

#### **3.6.2. Número de Repeticiones**

En esa investigación se realizaron tres repeticiones

### **3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En la investigación se realizó un análisis de varianza (ADEVA) como se describe en la tabla 3, para establecer a existencia de la diferencia significativa entre los tratamientos y una prueba de comparación Tukey al 5% para determinar la diferencia estadística significativa entre las medias, para la interpretación de los resultados se empleó el paquete estadístico INFOSTAT, Versión Profesional 2015

**Tabla 3. Análisis de varianza (ADEVA)**

<b>Fuente de variación (FV)</b>	<b>Grados de libertad (GL)</b>
<b>Total</b>	27
<b>Repeticiones</b>	3
<b>Tratamientos</b>	9
<b>Error</b>	15

**Autor: Tagle, R (2017)**

### **3.8. METODOLOGÍA**

#### **3.8.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizó leche entera UHT proveniente del Programa de alimentación escolar, como alimento base para el estudio (**Anexo 1**), así mismo mora, taxo, mortiño libres de abrasiones o daños físicos. Las frutas mora y taxo fueron adquiridas

en el mercado de la ciudad de Manta. A diferencia del mortiño se obtuvo de la ciudad de Quito.

### **Materiales**

- Caja Petri
- Micropipetas
- Papel filtro
- Puntas plásticas
- Tamiz
- Matraz aforadas
- Pinzas
- Vaso de precipitación de 25ml
- Tubo de ensayo

### **Reactivos**

- Agar BHI ((Brain Heart Infusion Broth)
- Agar Sangre de cordero al 5%
- Cepas del *S. mutans*
- Agua de peptona
- Agua destilada

### **Equipos**

- Autoclave (Numak – ZX-75KBS)
- Estufa 10 – 250°C (Ecocell – MC000690)
- Cabina de Seguridad Microbiológica, BIOBASE, BSC-1200IIA2
- Licuadora (Oster SW194DT, Reino Unido)

### **3.8.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE TAXO, MORA Y MORTIÑO**

**Limpieza y selección:** Una vez obtenidas las frutas frescas, estas fueron sometidas a un proceso de selección y limpieza para retirar cualquier impureza presente. Ver **Anexo 2**

**Trituración:** se utilizó una licuadora doméstica (Oster SW194DT, Reino Unido)

**Filtrado:** El jugo obtenido se filtró en una tela lienzo, eliminando las semillas o huesos, cáscaras, material fibroso.

Posteriormente la pulpa de la fruta extraída se añadió a la leche entera proveniente del PAE en porcentajes de 1, 2, 3% como saborizantes (**Anexo 3**) para hacer las mezclas de los extractos con leche se utilizó matraces aforados de 50ml (**Anexo 4**). A continuación en la **Tabla 4** se presenta las medidas de volúmenes para las mezclas de extracto de fruta y leche correspondientes para cada porcentaje.

**Tabla 4. Diluciones de extracto frutas en leche de PAE**

<b>Concentración de extracto de fruta (% v/v)</b>	<b>Volumen de Extracto</b>	<b>Volumen Leche Entera</b>
1%	0.5 ml	49.50 ml
2%	1 ml	49.00 ml
3%	1.5 ml	48.50 ml

**Autor: Tagle, R (2017)**

El **Anexo 5** describe las diluciones realizadas para cada tipo de fruta (mora, taxo y mortiño) es así que se obtuvo los nueve tratamientos descritos en la **Tabla 2**

### **3.8.3. ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE *STREPTOCOCCUS MUTANS***

Se empleó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997), Este método permite obtener resultados exactos mediante un procedimiento estandarizado, sencillo. Se realiza mediante la difusión de las sustancias activas en un medio solido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

La evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos presentes en las frutas se realizó en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC35668. Estos microorganismos fueron importados desde Minnesota, USA laboratorio Microbiologics.

Para preparar el inóculo, las cepas liofilizadas fueron activadas en caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth C5141 Criterion, USA), luego sembradas en cajas Petri con 20 ml de medio de cultivo agar sangre a 37°C durante 48 horas. Una vez activados los microorganismos en estudio, se prepararan suspensiones con las alícuotas correspondientes.

**Recuperación de la viabilidad de las cepas:** Antes de iniciar el análisis experimental se rehidrataron las cepas liofilizadas en caldo Brain Heart Infusion BHI Broth C5141 Criterion. Estas fueron incubadas en estufa a 37°C, por 48 horas en microaerofilia para su reproducción. Replicamos cada cepa en una placa de agar sangre, finalmente por cada cepa se preparó una suspensión bacteriana al 0.5 Mc Farland. (McFarland, 1907), que representa una concentración conocida de microorganismos la cual es de  $1.5 \times 10^8$  UFC., **(Anexo 6)**

Para evaluar la sensibilidad de *Streptococcus mutans* se colocó 1 ml de inóculo en cajas petri con agar sangre **(Anexo 7)**, posteriormente para evaluar la actividad antimicrobiana a los tratamientos se utilizó extracto de mora taxo y mortiño en concentraciones de 1, 2 3%.

Los agentes antimicrobianos se incorporaron directamente en los discos. Se depositó aproximadamente 20 µL de cada agente en estudio en discos de papel filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro como se observa en el **Anexo 8**. Posteriormente, estos serán colocados 3 equidistantes en cada placa que contiene el medio inoculado con *Streptococcus mutans* a analizar. **(Anexo 9)**

Este mismo procedimiento se realizó para la muestra control, leche saborizada del PAE como se observa en el **Anexo 10**

Las placas inoculadas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 2 días, como se observa en el **Anexo 11**. Se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano en (cm) los días 1, 2. En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado.

Se realizaron 3 ensayos válidos para cada concentración (1, 2, 3% v/v) y tipo de fruta (mora, taxo y mortiño), así mismo para el control (leche saborizada del PAE), se registró el halo de inhibición en cm de cada muestra y con los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza, y prueba de significancia de Tukey al 5% para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos.

#### **3.8.4. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL MEJOR TRATAMIENTO DE LECHE SABORIZADA**

Los mejores tratamientos del diseño experimental fueron utilizados para la realización de un análisis sensorial que permitió determinar la leche saborizada con extracto fruta con mayor aceptación. Para ello se realizó una prueba de análisis sensorial con 40 panelistas no entrenados de 17 a 25 años de edad, 25 mujeres y 15 hombres. Para establecer diferencia entre los tratamientos utilizados se empleó una escala hedónica de cinco puntos (**Anexo 12**) que va de “me disgusta mucho” a “me gusta mucho”.

El análisis de los resultados se realizó mediante análisis de varianza y prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia del 5% mediante el programa estadístico INFOSTAT Versión 2015

# CAPÍTULO IV

## DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Los datos obtenidos del halo de inhibición (**Anexo 13**) se procesaron para realizar cuadros de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p>0,05$ ) en 24 y 48 horas.

#### 4.1.1. Halo de inhibición de *Streptococcus mutans* en 24h

En la **Tabla 5** se muestra los resultados del análisis de varianza del halo de inhibición de *S. mutans* en 24 horas, con un coeficiente de variación de 15.49 mismo que se encuentra dentro de lo esperado para este tipo de trabajo de laboratorio en condiciones controladas.

**Tabla 5 Análisis de Varianza de inhibición de *S. mutans* en 24 h**

Variable	N	CV
Diámetro 24h	90	15.49

En la *Tabla 6* la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p>0,05$ ) nos indica que el diámetro de halo de inhibición luego de 24 horas, fue estadísticamente similar para mora y mortiño con medias que oscilaron entre 1.34 y 1.42 cm, tampoco no hubo diferencia estadística significativa entre mortiño y taxo (halos de inhibición entre 1.42 y 1.57 cm.). Finalmente hubo diferencia estadística de los tratamientos con el control, mismo que no presentó inhibición.

**Tabla 6 Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del *S. mutans* luego de 24 horas con respecto al tipo de fruta**

<b>Tipos de Frutas</b>	<b>Medias</b>		
<b>Control</b>	0.00	<b>A</b>	
<b>Mora</b>	1.34		<b>B</b>
<b>Mortiño</b>	1.42	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Taxo</b>	1.57		<b>C</b>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (  $p > 0,05$ )

**Error: 0, 0397    gl: 84**

La **Tabla 7** muestra que la leche con 3% de fruta fue estadísticamente diferente y presentó mayor inhibición (halo de 1.58 cm) que las muestras con otras concentraciones de fruta. No hubo diferencia estadística entre las concentraciones de 1 y 2%. Finalmente, el control no presentó inhibición.

**Tabla 7. Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del *S. mutans* luego de 24 horas con respecto a la concentración del extracto de fruta**

<b>Concentración de extracto de frutas</b>	<b>Medias</b>		
<b>0.00</b>	0.00	<b>A</b>	
<b>1.00</b>	1.37		<b>B</b>
<b>2.00</b>	1.39	<b>B</b>	
<b>3.00</b>	1.58		<b>C</b>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (  $p > 0,05$ )

**Error: 0, 0397    gl: 84**

Los resultados mostraron mayores halos de inhibición para taxo y mortiño (**Anexo 14**) lo que indica una mayor actividad inhibitoria sobre la cepa de *S. mutans* por parte de estas dos frutas en relación a la mora. Vasco et al. (2009) Categoriza al mortiño y taxo en un grupo de alto contenido de compuestos fenólicos y con alta capacidad antioxidante. Se presume que el grupo de

compuestos fenólicos presentes así como la alta actividad antioxidante tienen relación con el poder inhibitorio de esta bacteria.

#### 4.1.2. Halo de inhibición de *Streptococcus mutans* en 48h

El siguiente análisis de varianza de inhibición del *S. mutans* en 48 horas menciona un coeficiente de variación de 13.43 (**Tabla 8**) mismo que se encuentra dentro de lo esperado para este tipo de trabajo de laboratorio en condiciones controladas.

**Tabla 8 Análisis de Varianza de inhibición de *S. mutans* en 48 h**

Variable	N	CV
Diámetro 48h	90	13.43

Utilizando la prueba de comparación Tukey ( $p > 0,05$ ) al 95% de nivel de confianza, en la **Tabla 9** se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control donde no hubo inhibición, se observó que en 48 horas el halo de inhibición del taxo presenta una media de 1.46 cm pero que no tiene diferencia con mortiño donde la media del halo de inhibición es de 1.40 cm.

**Tabla 9 Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del *S. mutans* en 48 horas con respecto al tipo de fruta**

Tipo de Frutas	Medias		
Control	0.00	A	
Mora	1.31	B	
Mortiño	1.40	B	C
Taxo	1.46		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Error: 0, 0283    gl: 84

Con la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ), descrita en la **Tabla 10**, se compara las medias del halo de inhibición para las tres diferentes concentraciones de

extracto de frutas más el control, el análisis estadístico demuestra que 3% es la concentración con diferencia significativa de lo demás tratamientos presentando una media de 1.51 cm de halo de inhibición de *S. mutans*.

**Tabla 10. Prueba de comparación de medias de Tukey del halo de inhibición del *S. mutans* en 48 horas con respecto a la concentración del extracto de fruta**

Concentración	Medias	
0.00	0.00	A
1.00	1.32	B
2.00	1.35	B
3.00	1.51	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (  $p > 0,05$  )

Error: 0, 0283 **gl: 84**

La actividad de inhibición de frutas como taxo y mortiño frente a la cepa de *S. mutans*, aún es evidente en 48 horas, teorías detallan que el taxo es una fuente rica de flavan-3-ols y proantocianidinas, así mismo el mortiño en glicósidos de quercetina, ácidos hidroxicinámicos y antocianinas, compuestos fenólicos que al parecer reducen la proliferación de la bacteria *S. mutans*.

## 4.2. RESULTADOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL

En base a los resultados del diseño experimental se concluyó que los tratamientos con mayor efecto inhibitorio frente *S. mutans* fueron taxo y mortiño, para ser utilizados como saborizantes de leche, a una concentración de 1% (v/v), para no modificar la formulación de la leche del PAE.

Los resultados del análisis sensorial dieron un coeficiente de variación de 9,82, mismo que se encuentra dentro de lo esperado para este tipo de trabajo de laboratorio en condiciones controladas (**Tabla 11**)

**Tabla 11. Análisis de Varianza de Evaluación sensorial de leche saborizada**

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>CV</b>
<b>Calificación</b>	120	9.82

Los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 12**), indicaron que las tres muestras presentaron diferencias significativas entre sí. La muestra de mortiño presentó una media de 2.32 llevándolo a valores reales esto equivale a una puntuación de 4 (me gusta moderadamente) en la escala hedónica, así mismo la muestra de leche entera presentó una media de 2.17 que equivale a una puntuación de 3 (me es indiferente) y el taxo obtuvo una media menor de 1.93 que en valores reales es igual a 2 (me disgusta un poco).

**Tabla 12 Prueba de comparación Tukey de evaluación sensorial de leche saborizada**

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Medias*</b>	
<b>Taxo</b>	1.93	<b>A</b>
<b>Leche Entera</b>	2.17	<b>B</b>
<b>Mortiño</b>	2.32	<b>C</b>

**Error: 0, 0444    gl: 117**

**\*Análisis realizado sobre valores X+1**

La leche saborizada con mortiño obtuvo una mejor aceptación, con una puntuación de me gusta moderadamente, a pesar de que el taxo tiene mayor poder de inhibición del s. mutans este no podría ser utilizado como saborizante de leche.

# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- De acuerdo a análisis microbiológicos la fruta que presentó mayor poder inhibitorio sobre *S. mutans* fue el taxo, seguida del mortiño y finalmente la mora.
- Respecto a la concentración los análisis microbiológicos demostraron que la concentración con mayor poder inhibitorio fue la de 3%, seguida de 2 y 1%, siendo estas dos últimas estadísticamente iguales entre sí ( $p < 0.05$ ).
- Para la adición de fruta a la leche se trabajó con un nivel del 1%. Esto con el objeto de enmarcarse dentro de la formulación de la leche saborizada. Además considerando que la actividad inhibitoria a concentraciones del 1 y 2% es estadísticamente igual.
- El análisis de aceptabilidad dio como resultado que la mezcla mortiño-leche tuvo la mayor aceptación, con una calificación de “me gusta moderadamente”.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda al Programa de Alimentación Escolar el uso de taxo como materia prima en la elaboración de nuevos productos, esto por presentar alto poder de inhibición frente al *S. mutans*.
- Así mismo el uso de extracto de mortiño al 1% como saborizante de leche, ya que la mezcla mortiño-leche tuvo una mayor aceptación en el análisis sensorial realizado.
- Efectuar un análisis sensorial entre los consumidores del PAE con mezcla leche-fruta de los mejores tratamientos del estudio.
- Realizar estudios inhibitorios usando taxo en otros microorganismos responsables de la caries dental.
- Estudiar el efecto inhibitorio de otros tipos de frutas ancestrales frente al *Streptococcus mutans*.
- Uso de edulcorantes de bajo aporte calórico, como sustitutos del azúcar, que prevenga la enfermedad cariogénica.

## **PROPUESTA**

Por los resultados obtenidos en la presente investigación se surge como propuesta que el programa de alimentación escolar (PAE), junto con el Ministerio de Educación, realicen estudios similares que permita el uso de edulcorantes naturales, para reducir el uso de azúcares en los alimentos proporcionados a niños en edad escolar. Así mismo el uso de otro tipo de cultivos ancestrales que aporten beneficios en general a la salud que son desaprovechados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E., & Akhtar, M. (2006). Recent advances in the analyses of carotenoids. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2(2), 195-204. Retrieved febrero 2017
- Aguilera. (2011). Sensibilidad del *Streptococcus mutans* a tres enjuagues bucales. *ODOUS CIENTIFICA*, 12(1), 7-12. Recuperado el 1 de Marzo de 2017
- Avello, M., & Suwalsy, M. (2006). Radicales libres, Antioxidantes naturales y mecanismo de proteccion . *ATENEA*, 161-172.
- Carranco, M., Calvo, M., & Pérez, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante. *Revista Scielo Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, 6(3), 233-241.
- Castro, V. (2005). *INHIBICION DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE STREPTOCOCCUS MUTANS POR PAPAINA Y SANITREND*. TRABAJO DE INVESTIGACION REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DECIRUJANO-DENTISTA, UNIVERSIDAD DE CHILE, DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, Santiago, Chile.
- Chung, H., Kim, J., & Kwon, O. (2013). Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: Randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Journal of Functional Foods*, 5, 1502-1506.
- Cid, M. d., Martínez, I., & Morales, J. (2008). Ingestión de azúcares en niños menores de 1 año. *Revista Médica Electrónica*, 28(1), 113-116.
- Coba , P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*, 16(2), 5-13. doi:1390-3799
- Cona, T. (2002). Condiciones para un Buen Estudio de Susceptibilidad Mediante Test de Difusión en Agar. *Rev.Chil.Infectol*, 19(2), 77-81.

- Contreras, V. E., Bagán, S. J., & Gavaldá, C. (2001). Retinoides: su aplicación en las lesiones precancerosas y el cáncer oral. *Med Oral*, 6, 114-123.
- Cruz, L. A. (2000). *Cultivos de Exportacion no tradicional*. Quito: MAGAP.
- Duque de Estrada, J., Pérez, J., & Hidalgo, I. (Enero de 2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana*, 43(1).
- Engel, P. (2009). DSM Nutritional Products. *Human Nutrition and Health*.
- Escribano, M., & Matesanz, P. B. (2005). Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(2), 79-87. Recuperado el 24 de Febrero de 2017, de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2013000100005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005)
- Galas, M., Corso, A., Pasterán, F., & Ceriana, P. (2003). *XVII Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos*.
- Gonzalez S, A. M., Gonzalez N, B. A., & Gonzalez N, E. (Julio de 2013). Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. *Nutrición Hospitalaria*, 28(4), 64-71. Recuperado el 1 de Marzo de 2017, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112013001000008](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013001000008)
- Gonzalez, A., Espinoza, N., Pérez-H, J., Casado, L., & Cerero, R. (2008). Papel de los antioxidantes en la promoción de la salud oral. *Cient Dent*, 5(2), 107-115.
- Guerrero, C. A. (2012). *DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FIBRA DIETÉTICA EXTRAÍDA DE CULTIVOS ANCESTRALES ANDINOS PARA SU UTILIZACIÓN COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO*. Trabajo de Investigación , UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, Ambato.

- Hernandez, E. (2005). *EVALUACION SENSORIAL*. UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y ADISTANCIA – UNAD. Bogota: Centro Nacional de Medios para el aprendizaje.
- Hurtate, G. M. (1996). *Efecto inhibitorio de la infusion de llanten, sobre el crecimiento de microorganismos cariogenicos Lactobacillus acidophilus y Streptococcus mutans In Vitro*. Guatemala.
- INIAO. (2008). *Guía tecnica de cultivos*. Quito: Aida Villavicencio.
- Instituto De Provisión De Alimentos. (2014). “*INTERVENCIÓN EN LA ALIMENTACIÓN ESCOLAR*”. MAGAP, Quito. Obtenido de [www.proalimentos.gob.ec](http://www.proalimentos.gob.ec)
- Jensen, M. (1999). Dieta y caries dental. *Dent Clin North Am*, 43(4), 615-33.
- Jimenez, S. (2010). *Estudio investigativo del taxo, historia y aplicacion gastronomica en la ciudad de Quito*. Tesis de grado, Universidad Tecnologica Equinoccial, Quito. Recuperado el 22 de marzo de 2017, de [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11571/1/42358\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11571/1/42358_1.pdf)
- Ketterl. (1994). *Odontología conservadora: Cariología: Tratamiento mediante obturación*. Barcelona, España.
- Lara, A., & San Andres, E. (2009). *HABITOS ALIMENTICIOS Y SU INCIDENCIA EN LA FORMACION DE CARIES EN LOS NIÑOS PREESCOLARES DE LA ESCUELA ANDRES DE VERA*. Tesis de Grado, Universidad San Gregorio de Portoviejo, Portoviejo.
- Leon, P. (2016). *OBTENCIÓN DE UNA BASE DESHIDRATADA A PARTIR DE PULPA DE TAXO (Passiflora mollisima) CONSERVANDO CAROTENOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS*. PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL, ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL, FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA, Quito.
- Lohachoompol, V., Srzednicki, G., & Craske, J. (2004). The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 248-252.

- Loján, L. (2003). El verdor de los andes ecuatorianos realidades y promesas. *Proyecto Desarrollo Forestal Participativo en los Andes*, 296. Recuperado el 22 de marzo de 2017
- Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad*.
- Lopez, J. (2008). *Los Alimentos Funcionales: Importancia y Aplicaciones*. Chile.
- MAG. (2015). *Ministerio de agricultura y ganaderia*. Recuperado el 24 de Marzo de 2017, de <http://www.mag.go.cr>
- MAGAP. (2013). *Manual de Cultivo de la Mora*. Quito. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016, de <http://balcon.magap.gob.ec/mag01/magapaldia/HOMBRO%20A%20HOMBRO/manuales/Manual%20El%20cultivo%20de%20la%20%20mora.pdf>
- Márquez, E., & García, Y. (2007). Colorantes naturales de origen vegetal. Ciencia y Tecnología de Alimentos. *Revista ReCiTeIA: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria*, 17(1), 169-170.
- McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176-1178.
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Revista Scielo Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, 57(2), 109-117.
- Memon, A., Memon, N., Luthria, L., Bhanger, M., & Pitafi, A. (2010). Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L. *Morus alba* L.) Leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition*, 60(1), 25-32.
- Ministerio de Salud Pública. (2015). Caries. Guía Práctica Clínica. 1. Obtenido de <http://salud.gob.ec>

- Morales, A. (2011). Frutoterapia, nutrición y salud Plus vitae. *EDAF del Plata*(1), 212.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 17, 234-238.
- Núñez, D., & Garcia, L. (Junio de 2010). Bioquímica de la caries dental. *Rev haban cienc méd.*, 9(2). Recuperado el 2017 de Junio de 17, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2010000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004)
- OMS. (2004). *Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucales*. Ginebra. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/>
- Organizacion Mundial de la Salud. (2015). *Nota informativa sobre la ingesta de azúcares recomendada en la directriz de la OMS para adultos y niños*. Organizacion Mundial de la Salud, Departamento de Nutrición para la Salud y el Desarrollo, Ginebra. Obtenido de [http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugar\\_intake\\_information\\_note\\_es.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugar_intake_information_note_es.pdf)
- PAE. (2017). Recuperado el 2 de Marzo de 2017, de <http://www.pae.gob.ec/>
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Composition Analysis*, 21, 241-248.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Villa, J. L., & Bravo, J. A. (Diciembre de 2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. Obtenido de <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339682006>> ISSN 0250-5460
- Peralta, E. (2006). Importancia Cultivos Andinos. 42.
- Porrás, L. A., & Lopez, A. (2009). Importancia de los grupos fenolicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingenieria de Alimentos*, 3(1), 121-134.

Recuperado el Febrero de 2017, de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)

- Raza, X., Alvear, A., Andrade, R., Ayala, E., Chilliquinga, M., & Luque, I. (2010). *Estudio Epidemiológico Nacional de Salud Bucal en Escolares Menores de 15 años del Ecuador*. Quito: MSP/OPS.
- Rojano, B., Acosta, K., & Cortes, F. (2012). Free radical trapping capacity of *Passifloramollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Revista Cubana de plant med*, 17(4), 408-409.
- Rojas, P. J., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2014). CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MORA (*Rubus glaucus* Benth) OBTENIDOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 21(3), 218-227. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v21n3/v21n3a07.pdf>
- Roldan, S. (2012). *Caracterización molecular funcional y estudio del comportamiento post-cosecha del mortiño (*Vaccinium floribundum*) de la comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi*. PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL, ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL, FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA, Quito.
- Sánchez, E., Villagrán, E., & Vanegas, L. (2002). *ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE CARIES DENTAL Y FUOROSIS*. Guatemala.
- Sanchez-Salcedo, E., Mena, P., Garcia-Viguera, C., Martínez, J., & Hernández, F. (2015). Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *Journal of functional*, 12, 399-408.
- Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (noviembre de 2001). Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds: recent

developments. *Trends Food Science Technology*, 12(11), 401-413.  
Obtenido de [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)

Schneider, S., & Krause, A. B. (2014). *ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN OPERATIVA Y REDISEÑO DEL PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN ESCOLAR (PAE) EN ECUADOR*. Porto Alegre, Brasil.

Szajdek, A., & Borowska, E. (Diciembre de 2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 63(4), 147-156. Recuperado el 21 de Febrero de 2017

Vasco , C., Rihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum*). *J.Agric. Food Chem*, 57, 8274-8281. Recuperado el 24 de Mazo de 2017

Vasco, C. (2009). *Phenolic Compounds in Ecuadorian Fruits*. Tesis Doctoral, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science , Uppsala. Recuperado el 1 de Marzo de 2017

Vignarajah, S. (1997). Encuesta de frecuencia de los alimentos azucarados y el consumo de bebidas en escolares y adolescentes en una isla de las Indias Occidentales. *Antigua Int Den J*, 47(5), 293-7.

Wong, D. (1995). *Química de los alimentos: Mecanismos y Teoría*. Zaragoza, España: Acribia.

Zamora, J. (2007). Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutricion, Bromatología y Toxicología*, 64(1).

## ANEXOS

### Anexo 1. Leche entera de programa de alimentación escolar



### Anexo 2. Frutas empleadas en el estudio, mortiño, taxo y mora



### Anexo 3. Extracto de Frutas



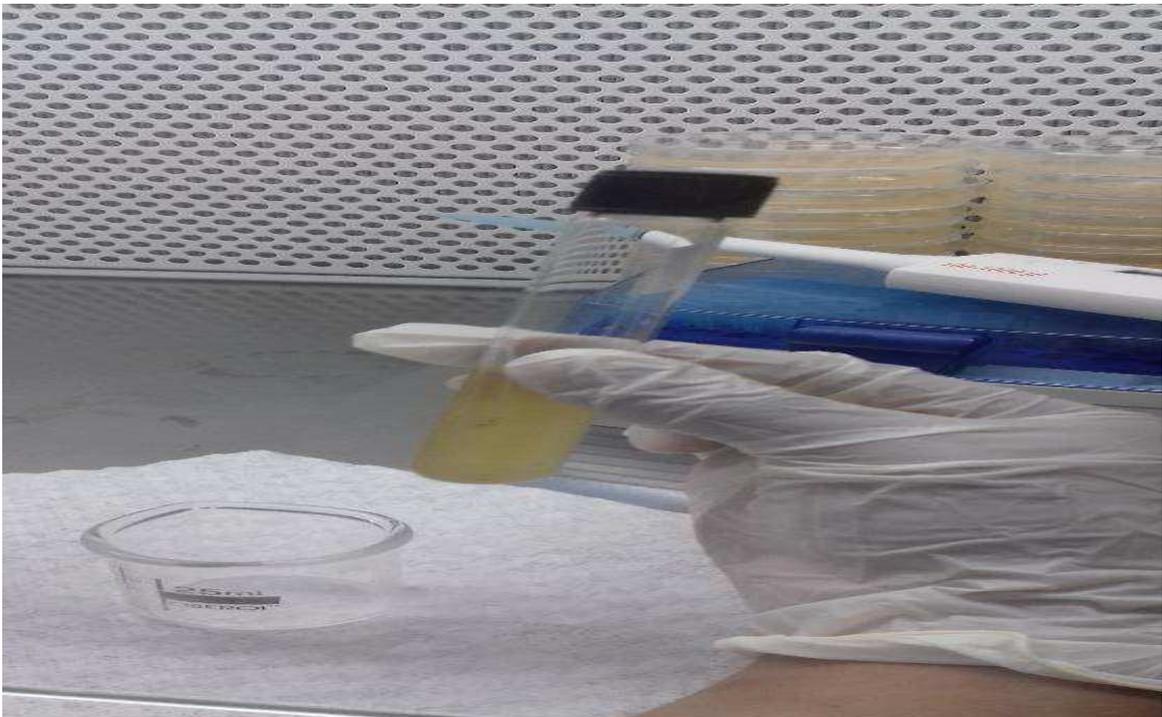
### Anexo 4. Preparación de las diluciones con extractos de frutas



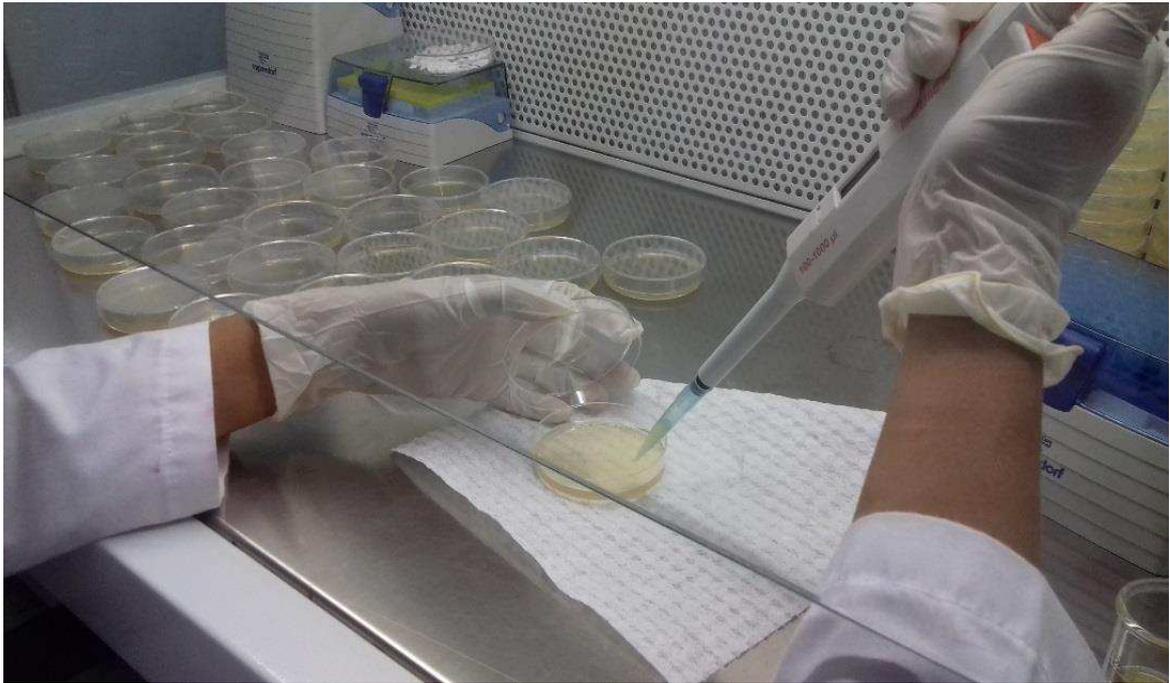
### Anexo 5 Diluciones de extracto de frutas en leche de PAE



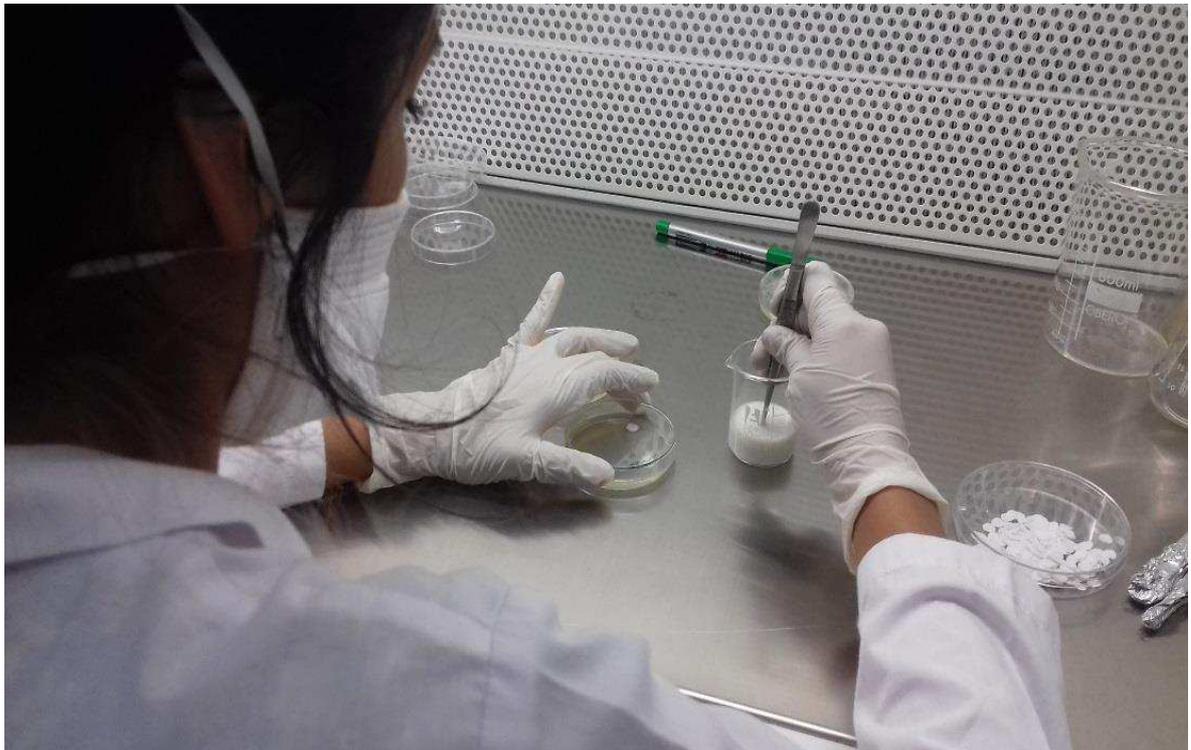
### Anexo 6 Dilución de Streptococcus mutans $1.5 \times 10^8$ UFC.



### Anexo 7. Siembra del *Streptococcus mutans* en agar sangre



### Anexo 8. Colocación del agente antimicrobiano en discos de papel filtro



**Anexo 9. Colocación de discos con los agente antimicrobianos en placas con *Streptococcus mutans***



**Anexo 10. Muestra Control, Leche Saborizada del PAE**



## Anexo 11. Incubación de las cajas petri



## Anexo 12. Escala hedónica utilizada en la evaluación sensorial de los mejores tratamientos

	<b>Universidad Laica Eloy Alfaro De Manabí</b> <b>Facultad Ciencias Agropecuarias</b> <b>Ingeniería Agroindustrial</b>		
<b>EVALUACIÓN SENSORIAL</b>			
NOMBRE: _____		FECHA: _____	
EDAD: _____		SEXO: _____	
<p>Frente a Usted hay tres muestras codificadas de Leche, las cuales debe probar una a la vez y marque con una X su juicio sobre cada muestra.</p>			
ESCALA	MUESTRAS		
	5497	1017	2402
5 Me gusta mucho			
4 Me gusta Moderadamente			
3 Me es indiferente			
2 Me disgusta un poco			
1 Me disgusta mucho			
COMENTARIO: _____			
_____			
_____			
<b>GRACIAS!</b>			

### Anexo 13. Diámetro de Halos de inhibición

MEDICIONES DE LOS HALO DE INHICIÓN (cm)																		
TRATAMIENTOS	REPETICIONES																	
	24 HORAS									48 HORAS								
	M1			M2			M3			M1			M2			M3		
MORA 1%	1.20	1.40	1.20	1.30	1.20	1.10	1.10	1.20	1.50	1.30	1.10	1.20	1.30	1.10	1.20	1.10	1.50	1.10
MORA 2%	1.30	1.10	1.50	1.50	1.50	1.10	1.50	1.50	1.60	1.30	1.00	1.30	1.50	1.30	1.10	1.50	1.60	1.50
MORA 3%	1.40	1.60	1.50	1.50	1.20	1.10	1.40	1.20	1.50	1.30	1.50	1.50	1.20	1.50	1.30	1.20	1.40	1.50
TAXO 1%	1.40	1.30	1.40	1.30	1.30	1.50	1.50	1.50	1.50	1.30	1.20	1.40	1.10	1.20	1.40	1.50	1.30	1.40
TAXO 2%	1.50	1.60	1.30	1.50	1.20	1.40	1.50	1.20	1.30	1.40	1.20	1.50	1.20	1.40	1.50	1.40	1.20	1.30
TAXO 3%	2.40	2.20	1.60	2.00	1.70	1.90	1.80	1.80	1.90	2.00	1.90	1.50	1.90	1.80	1.60	1.50	1.70	1.70
MORTIÑO 1%	1.60	1.50	1.20	1.50	1.50	1.20	1.20	1.50	1.60	1.60	1.50	1.60	1.40	1.40	1.10	1.20	1.50	1.60
MORTIÑO 2%	1.50	1.50	1.40	1.30	1.30	1.30	1.20	1.50	1.30	1.50	1.50	1.30	1.30	1.20	1.30	1.30	1.50	1.30
MORTIÑO 3%	1.50	1.10	1.30	1.30	1.20	2.00	1.50	1.50	1.50	1.30	1.40	1.20	1.90	1.40	1.30	1.50	1.40	1.40
CONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

**Anexo 14. Halo de inhibición de los diferentes tratamientos**

TIPOS DE FRUTAS	CONCENTRACIÓN	HALO DE INHIBICIÓN
<b>MORA</b>	1%	
	2%	
	3%	
<b>TAXO</b>	1%	

	2%	
	3%	
MORTIÑO	1%	
	2%	
	3%	

## Anexo 15. Evaluación Sensorial

