

Efecto in vitro de extractos Etanólicos del fruto de *Vitis vinífera* (UVA) Y *Annona muricata* (guanábana), en la formación de biofilms *Streptococcus mutans* ATCC 25175

EFFECT OF ETHANOL EXTRACTS in vitro FRUIT OF *Vitis vinifera* (UVA) and *Annona muricata* (SOURSOP), IN BIOFILMS FORMATION OF *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Jose González Cabeza¹, Elio Ávila Vereau², Lennis Reyna López³, Kellyn Gómez Castro⁴ y Alexander Terán Rojas⁵

Recibido: 02 de noviembre de 2015

Aceptado: 10 de diciembre de 2015

Resumen

Se realizó el estudio de los extractos etanólicos de las semillas de *Annona muricata* y las pieles del fruto de *Vitis vinífera*, sobre la formación de biofilms desarrollados por *Streptococcus mutans* ATCC 25175; todo ello, con el propósito de buscar alternativas naturales que puedan inhibir la formación de biofilms bacterianos (placa bacteriana) en la cavidad bucal y prevenir la caries. En ambas ex-

periencias, se demostró que existe cierto efecto inhibidor del crecimiento microbiano, principalmente con las dos máximas concentraciones ensayadas; no obstante, a concentraciones menores existe una ligera recuperación del crecimiento. En cuanto a la inhibición del desarrollo de biofilms, resultó por el contrario promotor de la formación de biofilms con las máximas concentraciones.

Abstract

The study of the ethanol extracts of *Annona muricata* seeds and skins of the fruit of *Vitis vinifera*, on the formation of biofilms developed by *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was conducted; all with the purpose of seeking natural alternatives that can inhibit the formation of bacterial biofilms (plaque) in the oral cavity and to prevent cavities. In both experiences, it was shown that there is some inhibitory effect of microbial growth, particularly with the two

highest concentrations tested; however, at lower concentrations there is a slight recovery of growth. As for inhibiting the growth of biofilms, was conversely enhance the formation of biofilms with peak concentrations.

Keywords: Biofilms / *Annona muricata* / *Vitis vinifera* / Extracto etanólico.

1 Biólogo. Doctor en Biotecnología. Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología. Dpto. Académico de Ciencias. UPAO. gonzalezbiotec@hotmail.com

2 Mblgo. M.Sc. en Salud Pública. Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología. Dpto. Académico de Ciencias. UPAO.

3 Mblgo. M.Sc. en Salud Pública. Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología. Dpto. Académico de Ciencias. UPAO.

4 Mblgo. M.Sc. en Mblgía. y Tec. de Alimentos. Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología. Dpto. Académico de Ciencias. UPAO.

5 Téc. de Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología. Dpto. Académico de Ciencias. UPAO.

I. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una patología infectocontagiosa de etiología bacteriana, muy común en seres humanos y de gran prevalencia en la población mundial; por tanto, se constituye en uno de los mayores problemas de salud pública (Joaquín *et al.*, 2001; Stephen, 1993). Esta es principalmente producida por la acción de microorganismos que forman parte de la placa bacteriana, especialmente consecuencia de la fermentación de carbohidratos, originando la desmineralización gradual de la hidroxiapatita, seguida de la destrucción proteolítica rápida de la estructura dental, hasta llegar a la pérdida total del diente (Joaquín *et al.*, 2001; Albala *et al.*, 1998; Palomer, 2006).

Entre los principales microorganismos de la placa bacteriana, implicados en el inicio y desarrollo de la caries son, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* y *Actinomyces spp.* (Loesche, *et al.*, 1986; Vaananen, *et al.*, 1994; Linossier, 1996; Liebana 1995; Gregory, *et al.* 1998; Camejo, M., 1999; Tanzer, *et al.*, 2001).

En ese sentido, *S. mutans* presenta múltiples factores de virulencia; entre éstos tenemos: 1. La producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa (formación de cápsula), en especial los glucanos insolubles que son muy importantes en la colonización y mantenimiento de esta bacteria sobre el diente. 2. Poseer elementos que determinan fenómenos de adhesión, agregación y congregación. 3. La producción y metabolización de polisacáridos intracelulares, los que le permiten obtener energía y producir ácidos durante largos periodos de tiempo. 4. Un rápido metabolismo de los azúcares (particularmente sacarosa) a ácido láctico, y producción de otros ácidos orgánicos. 5. Poder acidógeno. 6. Poder acidófilo. 7. Poder acidúrico, que puede conseguir un pH crítico para la desmineralización del esmalte más rápidamente que otro microorganismo de la placa. (Liebana 1995; Linossier A, 1996; Tanzer, *et al.*, 2001; Shi, *et al.* 1998; Escobar, *et al.* 2004). No obstante, los antecedentes establecen que el control de la infección cariogénica, y consecuentemente el control de la caries, puede efectuarse a través de: a. La interrupción de la transmisión del *Streptococcus mutans*. b. De su eliminación y/o reducción. c. Protección de las personas susceptibles, con la implementación del control dietético y el uso de sustancias antimicrobianas (Weyne, 1991 Escobar, *et al.*, 2004).

Bajo esta perspectiva, se ha ensayado el empleo de numerosos antibióticos, como bacitracina, eritromicina, lincomicina, penicilina, espiramicina, tetraciclina, vancomicina, entre otros; que lamentablemente muestran enormes inconvenientes, como la aparición de cepas microbianas resistentes, alteraciones ecológicas en el ecosistema bucal, que producen un perjuicio para el huésped (candidiasis), reacciones laterales, alergia, etc. (Escobar F. *et al.*, 2004). Aún así, es continua la investigación

sobre el uso de sustancias con propiedades antibacterianas específicas contra la placa bacteriana y que comúnmente son utilizadas en la terapéutica general (Escobar, *et al.*, 2004); entre las más empleadas, están formuladas en colutorios y geles, y entre los que tenemos al gluconato de clorhexidina, triclosan, hexitidina, compuestos fenólicos, etc; siendo el gluconato de clorhexidina, el que presenta los mejores resultados por su capacidad de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* (Camejo, 1999; Velikova M. *et al.* 2001), pero con el inconveniente de producir efectos tóxicos locales como, tinción de dientes y obturaciones, pigmentación del dorso de la lengua, descamación de la mucosa bucal, gusto amargo o modificación gustativa, sensación de quemadura, sequedad bucal e inflamación ocasional y transitoria de la parótida. (Escobar, *et al.* 2004; Camejo, 1999).

En el presente trabajo se propone el ensayo *in vitro* con ciertos extractos naturales, como el procedente de los hollejos del fruto de *Vitis vinífera* y las semillas de *Annona muricata*. *Vitis vinífera* es una vaya globosa, pequeña, de pulpa muy jugosa, un hollejo fuerte, de colores, con semillas de color marrón claro y se presenta en racimos, compuestos de 4/5 partes de agua y 1/5 partes de elementos sólidos (Camejo M., 1999). El fruto caracterizado especialmente por su riqueza cualitativa y cuantitativa en constituyentes fenólicos, localizados esencialmente en sus partes sólidas (pepitas, pieles, raspones), donde encontramos actividades biológicas importantes en las que los investigadores y los industriales se interesan cada vez más (Escobar, 2004; Stepanovic S. *et al.*, 2003). Los mostos o racimos de *Vitis vinífera*, contienen diversos constituyentes como hierro, agua, potasio, calcio, silicio, fósforo, sodio, magnesio, cloro, proteínas, hidratos de carbono, calorías, vitaminas (A, B1, B2, B6, B3 y C), azufre, zinc, yodo, boro, ácido tartárico, cítrico, tanino y málico, glucosa, pigmentos y enzimas (Camejo M., 1999; Velikova M, *et al.*, 2001). Consecuencia de ello, tienen un interés nutricional y farmacológico, principalmente por sus compuestos fenólicos, de los cuales se puede rescatar los no flavonoides en la pulpa como ácidos fenólicos y estilbenos; y los flavonoides en los hollejos, semillas y raspones, (antocianos, los flavonos 3-oles, flavonoles y flavonas) (Camejo M., 1999).

De otro lado, el fruto de *Annona muricata* (guanábana) es una baya colectiva o sin carpo, de forma acorazonada u ovoide, con pericarpio (cáscara) verdoso con tubérculos espiniformes carnosos, la pulpa es blanca y jugosa de sabor agridulce, las semillas de color negro lustroso o castaño con hojas gruesas y siempre verdes, brillantes en la parte inferior, de amplia distribución y en la cual se han encontrado más de 50 acetogeninas con diferentes actividades biológicas presentes en frutos, corteza y hojas; de ellas se han identificando 21 acetogeninas citotóxicas en las hojas (Kim G.S. *et al.*, 1998).

Vitis vinífera y *Annona muricata* son especies que

han demostrado tener efectos benéficos sobre la salud del ser humano; sin embargo, la investigación de dichas especies en el campo de la estomatología es mínima, y la evidencia de sus efectos benefactores para la salud oral es escasamente conocida, basándose su uso principalmente en el respaldo de creencias populares.

Debido a ello, la presente investigación se centra en el estudio de los beneficios que ofrecen los extractos etanólicos de *Vitis vinifera* y *Annona muricata* (guanábana) como agentes inhibidores del desarrollo de biofilms de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, en aras de contribuir con la continua búsqueda de un agente ideal.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Recolección de material biológico

Los especímenes de *Annona muricata* y *Vitis vinifera* fueron recolectados de la ciudad de Trujillo, siendo evaluados e identificados por el personal del Museo de Historia Natural y Cultural de la UPAO. Resultaron ideales para el estudio, todas aquellos especímenes que no presentaban alteraciones organolépticas.

Obtención de los extractos etanólicos

Las semillas de *Annona muricata* y las pieles de *Vitis vinifera* fueron retiradas de los frutos y sometidas al enjuague con agua destilada, y su posterior desecación a 50°C (horno Pasteur) durante al menos cinco días. En el caso de las semillas de *Annona*, se pulverizaron empleando un molino manual, mientras que para las pieles tan solo se empleo un mortero de mano (figura 1).

Para las muestras procedentes de *Vitis vinifera*, los pulverizados se suspendieron en alcohol etílico en una proporción de 5 g de muestra en 50 mL de alcohol etílico; mientras que para las semillas de *Annona* se pesaron 30 g en 100 mL de alcohol etílico. Todas las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en agitación continua a razón de 150 rpm durante 05 días.

Transcurrido el tiempo señalado, las muestras se filtraron en algodón y desecadas en rotavapor y resuspendidas en agua destilada para su posterior agitación durante al menos 24 h. Las suspensiones se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 m (figura 2), se recuperó el sobrenadante y fue esterilizado mediante filtración, empleando papel de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45µm. Los controles de esterilidad se realizaron sembrando 100 µL de las muestras sobre agar Müller-Hinton durante 24 h.

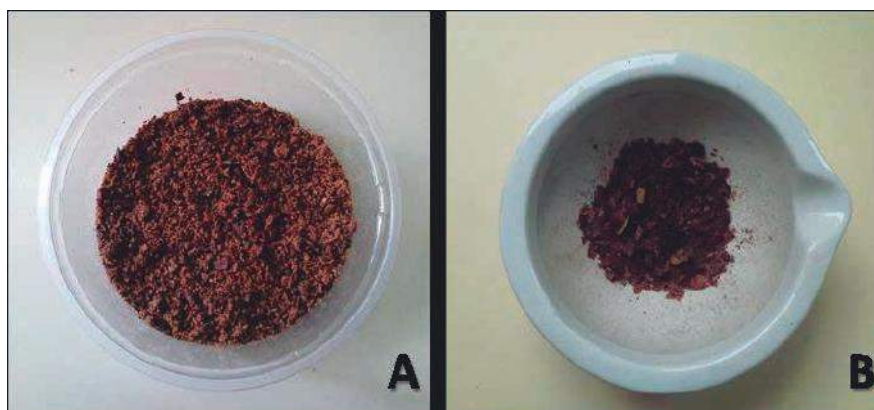


Figura 1. Deshidratado y pulverizado de *Annona muricata* (A) y hollejos de *Vitis vinifera* (B).

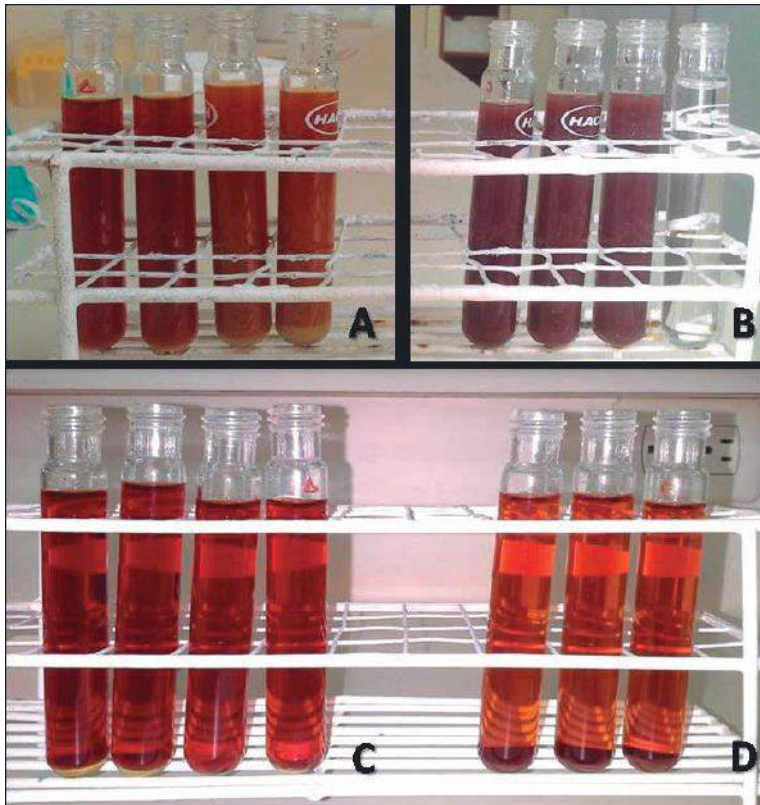


Figura 2. Recuperación de extractos etanólicos de *Annona muricata* y *Vitis vinifera* sin centrifugar (A y B), y centrifugado (C y D).

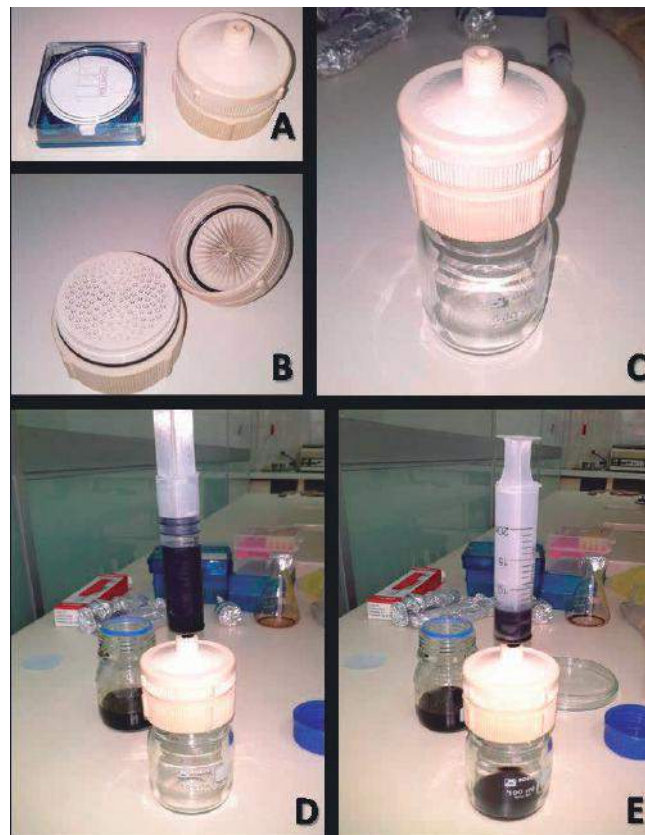


Figura 3. Esterilización por filtración de los extractos de *Annona muricata* y *Vitis vinifera*. Sistema de filtración constituido por papel filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm de tamaño de poro (A). Sistema de filtración de 4,5 cm de diámetro (B). Sistema de filtración montado sobre botella estéril (C). Procedimiento de filtrado de extractos (D y E).

Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Esta cepa fue obtenida de nuestro propio cepario, el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento Académico de Ciencias de la UPAO. Los viales criogénicos mantenidos a -30°C, fueron retirados y mantenidos a -4°C por cuatro horas, y posteriormente a temperatura ambiente al menos durante cuatro horas más. A partir de ello, la cepa fue sembrada en agar nutritivo bajo condiciones de anaerobiosis en jarra Gaspack y una atmósfera de CO₂ (5-10%) durante 24 h a 37°C. Al término, se efectuaron las debidas comprobaciones fenotípicas de la cepa a ensayar.

Placas master y overnight

Recuperada la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se obtuvieron 5 placas master en agar nutritivo, a partir de las cuales se realizaron siembras para el overnight en caldo Luria-Bertani (LB) (Tripton 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro de sodio 1%) e incubadas durante 18-24 h en condiciones de anaerobiosis. Para los ensayos, se tomaron 4 mL del overnight y resuspendidos en 16 mL de caldo LB fresco.

PRUEBA DE MACRODILUCIÓN EN TUBO

A continuación se muestra el protocolo a seguir para el ensayo de macrodilución en tubo.

ENSAYO DE MACRODILUCION EN TUBO

DILUCIONES

	Control	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
H2O d	10 ml	–	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Pdto. "X"	–	5 ml	5 ml											
Agitar+Adicionar		5 ml de anterior		5 ml de T1	5 ml de T2	5 ml de T3	5 ml de T4	5 ml de T5	5 ml de T6	5 ml de T7	5 ml de T8	5 ml de T9	5 ml de T10	5 ml de T11

CONTROL

	Control	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
LB 2x	2 ml	4 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Diluciones	2 ml	–	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Cepa	–	–	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lectura DO 550	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Lectura DO 620	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

ENSAYO

	Control	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
LB 2x	4 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Diluciones	–	2 ml H2Od	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Cepa	100 µl	–	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubar	24 hrs.	–	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.
Lectura DO 550	√	–	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Lectura DO 620	√	–	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

PRUEBA DE FORMACIÓN DE BIOFILM

Se empleó la metodología descrita por Christensen en 1985, con ciertas modificaciones en las determinaciones cuantitativas. De la resiembra obtenida del cultivo *overnight* de la cepa de referencia, se tomó un volumen de 100 µL y se inoculó en tubos de ensayo (10 X 100 mm) de primer uso que contenía el caldo LB, y la dilución del extracto a ensayar. Inmediatamente se efectuaron las lecturas de DO_(λ = 550) de cada uno de los tubos, así como los respectivos controles, en los cuales no contenían la cepa, y en el otro que sí la contenía, pero carente de extracto. Asimismo se estableció la curva de crecimiento patrón bajo esta metodología, con el fin de establecer el tiempo aproximado para alcanzar la densidad óptica requerida. Los cultivos fueron incubados durante 24 h a 37°C y en anaerobiosis; al término del cual para evaluar el crecimiento planctónico, se trasvasó el contenido a nuevos tubos de ensayo.

Los tubos de ensayo sin el sobrenadante fueron enjugados en agua destilada estéril e invertidos sobre papel absorbente. Este lavado se repitió dos veces, sacudiendo de forma enérgica con el fin de retirar las bacterias en estado planctónico que no forman parte del biofilm. Retirado todo el medio, se añadió Cristal violeta al 1% a cada tubo de ensayo, durante 5 minutos y se descartó el colorante de forma invertida, lavando con agua destilada estéril dos veces, de igual forma que en el paso anterior.

Retirado el colorante se adicionaron 2 mL de alcohol acetona (95 partes de alcohol + 5 partes de acetona) por tubo, durante 10 minutos, para disolver el colorante y medir la absorbancia de la solución.

El cristal violeta es un colorante básico, que se une a moléculas con carga negativa en su superficie y a los polisacáridos en la matriz extracelular, por lo tanto, la absorbancia obtenida se estima proporcional a la biomasa del biofilm formado.

III. RESULTADOS

Los primeros resultados corresponden al estudio del efecto de diferentes concentraciones del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* (guanábana), sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al cabo de 24 h. de incubación. Estos mostraron una inhibición del crecimiento en las dos primeras concentraciones; sin embargo, a partir de la tercera dilución existe un incremento moderado en el crecimiento (tabla 1, y figura 4).

Series de tubos	Dilución %	DENSIDAD ÓPTICA (550 nm)					
		n1	n2	n3	n4	MEDIA	DES.ST.
1	100	0,205	0,255	0,239	0,288	0,247	0,035
2	50	0,185	0,118	0,284	0,34	0,232	0,099
3	25	0,176	0,204	0,286	0,383	0,262	0,093
4	12,5	0,206	0,23	0,29	0,356	0,271	0,067
5	6,25	0,226	0,219	0,293	0,379	0,279	0,074
6	3,125	0,217	0,23	0,319	0,361	0,282	0,070
7	1,56	0,235	0,22	0,305	0,378	0,285	0,073
8	0,78	0,224	0,226	0,377	0,362	0,297	0,084
9	0,39	0,223	0,219	0,367	0,37	0,295	0,085
10	0,19	0,241	0,224	0,375	0,376	0,304	0,083
11	0,09	0,228	0,224	0,385	0,383	0,305	0,091
12	0,04	0,213	0,216	0,348			0,077
Blanco		0,218	0,218	0,225	0,225	0,222	0,004

TABLA 1. Lecturas de densidades ópticas para el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Annona muricata* (guanábana) al término de las 24 horas.

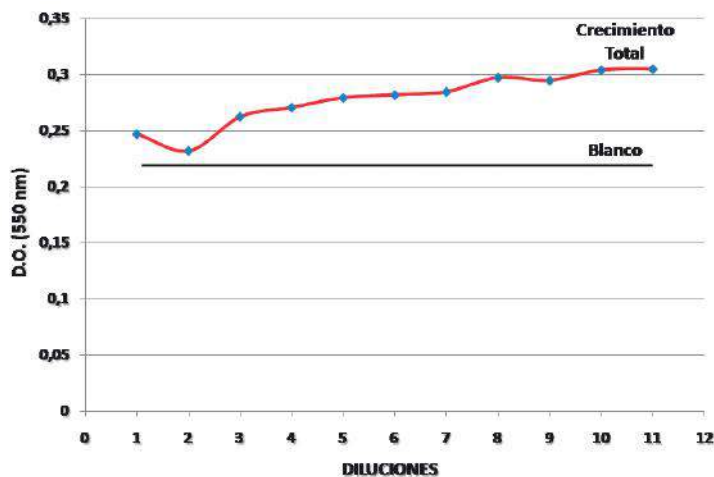


FIGURA 4. Curva de Crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Annona muricata* (guanábana) al término de las 24 horas.

Los resultados anteriores muestran el crecimiento total; y entendido como tal, al crecimiento microbiano en estado planctónico, así como al desarrollo del posible biofilm. Por tanto, se evaluó tan solo el crecimiento en estado planctónico, trasvasando la suspensión microbiana a nuevos tubos de ensayos, resultados que aparecen descritos en la tabla 2 y figura 5 y los cuales presentan un patrón de crecimiento muy similar a los resultados anteriores.

Series de tubos	Dilución %	DENSIDAD ÓPTICA (550 nm)			
		n1	n2	MEDIA	DESV. ST.
1	100	0,222	0,22	0,221	0,001
2	50	0,225	0,307	0,266	0,058
3	25	0,28	0,324	0,302	0,031
4	12,5	0,298	0,333	0,316	0,025
5	6,25	0,29	0,326	0,308	0,025
6	3,125	0,284	0,33	0,307	0,033
7	1,56	0,294	0,34	0,317	0,033
8	0,78	0,354	0,351	0,353	0,002
9	0,39	0,339	0,343	0,341	0,003
10	0,19	0,35	0,345	0,348	0,004
11	0,09	0,357	0,353	0,355	0,003
Blanco		0,225	0,235	0,230	0,007

TABLA 2. Lecturas de densidades ópticas para el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en estado planctónico, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Annona muricata* (guanábana) al término de las 24 horas.

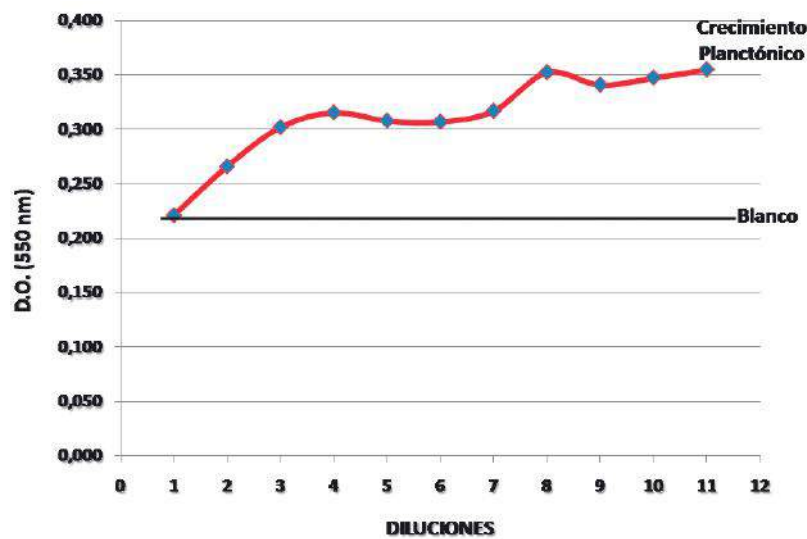


FIGURA 5. Curva de crecimiento planctónico de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Annona muricata* (guanábana) al término de las 24 horas.

A partir de las muestras de aquellos tubos iniciales, se procedió a la evaluación del biofilm formado en las paredes internas de los tubos de ensayo; tal como aparecen descritos en la figura 4; los cuales fueron coloreados con cristal violeta y su posterior decoloración con alcohol-acetona para la evaluación de su DO. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3 y figura 6.

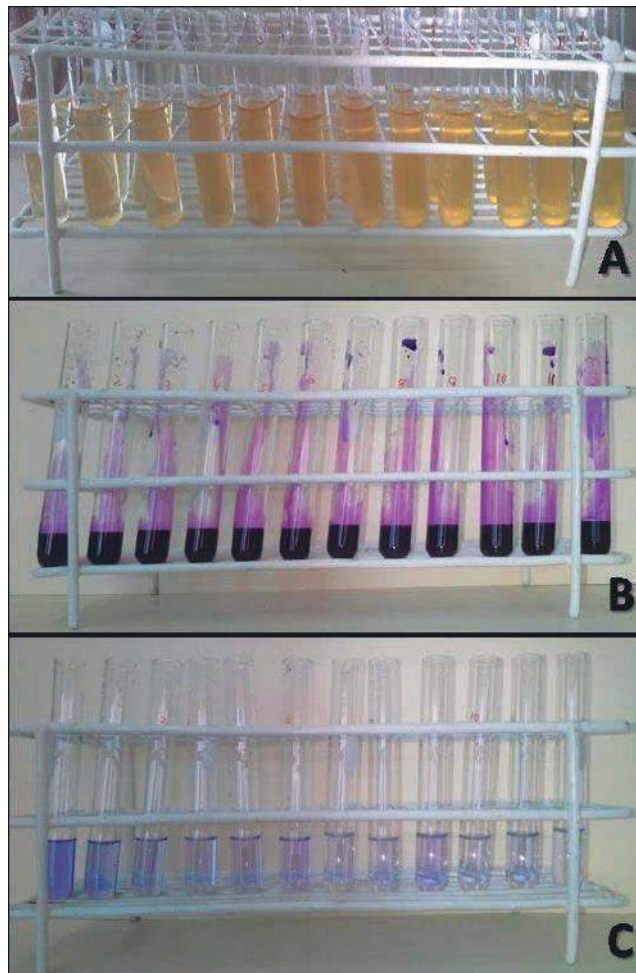


Figura 4. Procedimiento seguido en el estudio de la formación de biofilms de *Annona muricata* y *Vitis vinífera*. Prueba de macrodilución en tubo (A). Coloración con cristal violeta, posterior a la eliminación del sobrenadante (B). Decoloración de los biofilms con etanol para su posterior lectura espectrofotométrica (C).

Frente a lo esperado, por el contrario, se observó que existía formación de biofilms con las concentraciones más elevadas, las cuales se traducen con una lectura mayor de densidad óptica en las dos primeras concentraciones (tabla 3 y figura 6), para posteriormente ir disminuyendo.

Series de tubos	Dilución %	DENSIDAD ÓPTICA - 550 nm			
		n1	n2	MEDIA	DESV.ST.
1	100	0.59	0.957	0.774	0.260
2	50	0.244	0.456	0.350	0.150
3	25	0.113	0.109	0.111	0.003
4	12,5	0.074	0.328	0.201	0.180
5	6,25	0.1	0.051	0.076	0.035
6	3,125	0.139	0.136	0.138	0.002
7	1,56	0.032	0.105	0.069	0.052
8	0,78	0.052	0.085	0.069	0.023
9	0,39	0.138	0.101	0.120	0.026
10	0,19	0.04	0.106	0.073	0.047
11	0,09	0.072	0.142	0.107	0.049
12		0.029	0.305	0.167	0.195
Blanco		0.008	0.008	0.008	0.000

TABLA 3. DO en el desarrollo de biofilms de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Annona muricata* (guanábana) al término de las 24 horas.

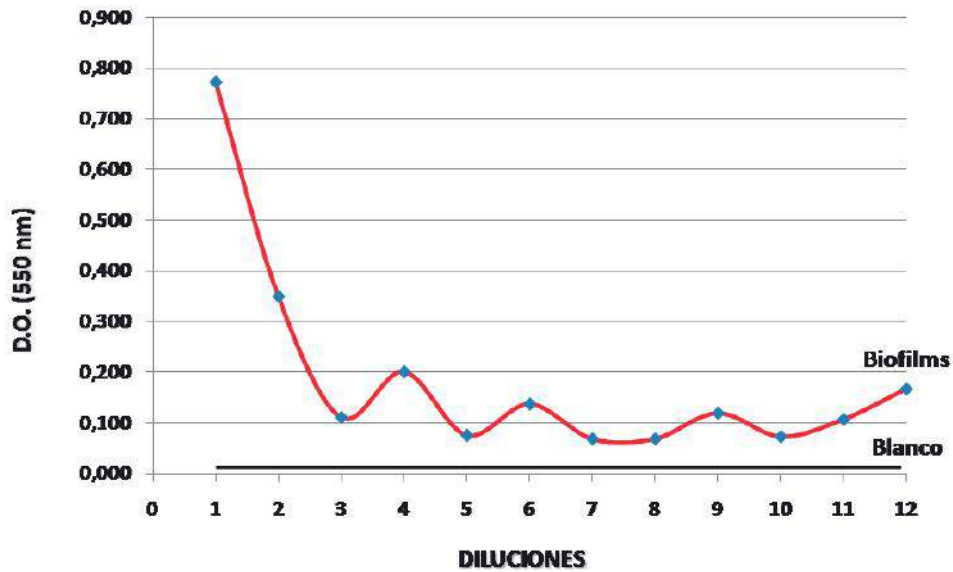


FIGURA 6. Cinética del desarrollo de biofilms en *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Annona muricata* (guanábana) al término de las 24 horas.

En cuanto a los resultados obtenidos de *Vitis vinifera*, el crecimiento total bajo diferentes concentraciones del extracto etanólico están expuestos en la tabla 4 y figura 7, en la que se puede observar que la primera concentración inhibe el crecimiento, mientras que a partir de la segunda concentración no es inhibido dicho crecimiento.

De igual forma, cuando se evaluó el crecimiento de células planctónicas siguiendo la misma metodología empleada con *Annona*, se encontró el mismo patrón de desarrollo (tabla 5 y figura 8).

Series de tubos	Dilución %	DENSIDAD ÓPTICA (550 nm)						
		n1	n2	n3	n4	n5	PROMEDIO	DES.EST.
1	100	0,179	0,19	0,21	0,222	0,213	0,203	0,018
2	50	0,243	0,223	0,215	0,224	0,287	0,238	0,029
3	25	0,314	0,32	0,301	0,298	0,315	0,310	0,010
4	12,5	0,36	0,341	0,326	0,362	0,331	0,344	0,016
5	6,25	0,37	0,385	0,398	0,361	0,348	0,372	0,020
6	3,125	0,373	0,399	0,402	0,389	0,379	0,388	0,012
7	1,56	0,39	0,35	0,378	0,388	0,397	0,381	0,018
8	0,78	0,387	0,376	0,387	0,379	0,388	0,383	0,006
9	0,39	0,382	0,384	0,412	0,389	0,392	0,392	0,012
10	0,19	0,373	0,359	0,369	0,377	0,409	0,377	0,019
11	0,09	0,368	0,384	0,389	0,388	0,413	0,388	0,016
Blanco		0,218	0,218	0,225	0,225		0,223	0,004

TABLA 4. Lecturas de densidades ópticas para el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Vitis vinifera* (uva) al término de las 24 horas.

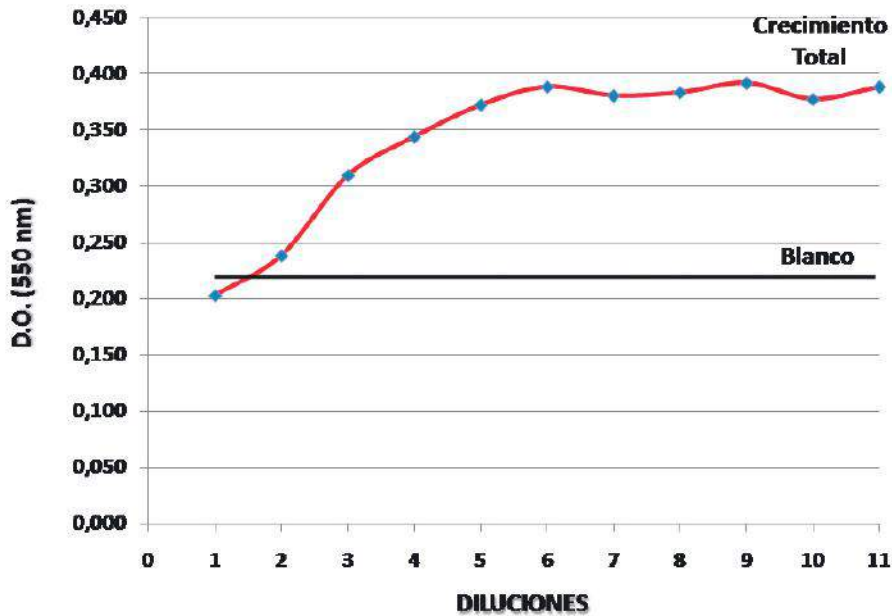


FIGURA 7. Curva de crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Vitis vinifera* (uva) al término de las 24 horas.

Series de tubos	Dilución %	DENSIDAD ÓPTICA (550 nm)						
		n1	n2	n3	n4	n5	PROMEDIO	DES.EST.
1	100	0,139	0,144	0,165	0,112	0,121	0,136	0,021
2	50	0,156	0,168	0,155	0,173	0,182	0,167	0,011
3	25	0,272	0,273	0,264	0,247	0,287	0,269	0,015
4	12,5	0,311	0,305	0,298	0,299	0,312	0,305	0,007
5	6,25	0,352	0,336	0,367	0,341	0,387	0,357	0,021
6	3,125	0,34	0,361	0,376	0,364	0,366	0,361	0,013
7	1,56	0,325	0,335	0,336	0,389	0,364	0,350	0,026
8	0,78	0,355	0,346	0,369	0,364	0,366	0,360	0,009
9	0,39	0,351	0,35	0,365	0,398	0,369	0,367	0,019
10	0,19	0,353	0,341	0,351	0,388	0,361	0,359	0,018
11	0,09	0,355	0,345	0,364	0,386	0,314	0,353	0,026
Blanco		0,125	0,143	0,133			0,134	0,013

TABLA 5. Lecturas de densidades ópticas para el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en estado planctónico, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Vitis vinifera* (uva) al término de las 24 horas.

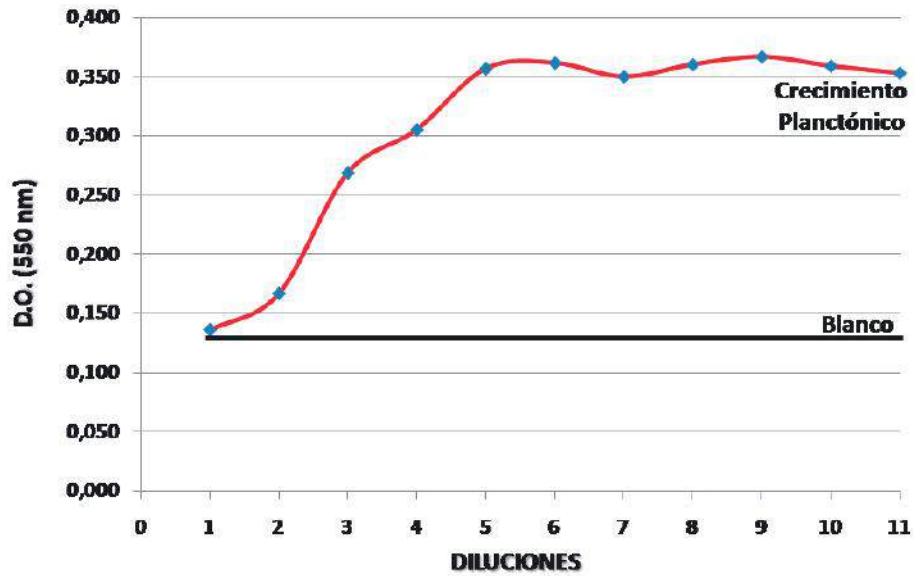


FIGURA 8. Curva de crecimiento planctónico de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Vitis vinifera* (uva) al término de las 24 horas.

En cuanto a la inhibición de la formación de biofilms, observamos a través de la tabla 6 y figura 9 que no existe tal inhibición, por el contrario a concentraciones mayores se promueve su formación.

Series de tubos	Dilución %	DENSIDAD ÓPTICA (550 nm)						
		n1	n2	n3	n4	n5	PROMEDIO	DES.EST.
1	100	0.466	0.145	0.231	0.133	0.112	0.217	0.146
2	50	0.206	0.134	0.187	0.163	0.161	0.170	0.027
3	25	0.183	0.082	0.148	0.122	0.115	0.130	0.038
4	12.5	0.131	0.102	0.091	0.095	0.109	0.106	0.016
5	6.25	0.081	0.102	0.125	0.087	0.094	0.098	0.017
6	3.125	0.067	0.148	0.121	0.088	0.073	0.099	0.034
7	1.56	0.07	0.072	0.083	0.094	0.086	0.081	0.010
8	0.78	0.094	0.064	0.088	0.049	0.098	0.079	0.021
9	0.39	0.075	0.067	0.085	0.064	0.093	0.077	0.012
10	0.19	0.06	0.064	0.076	0.069	0.065	0.067	0.006
11	0.09	0.079	0.062	0.081	0.092	0.101	0.083	0.015
Blanco		0.008	0.008				0.008	0.00

TABLA 6. DO en el desarrollo de biofilms de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Vitis vinifera* (uva) al término de las 24 horas.

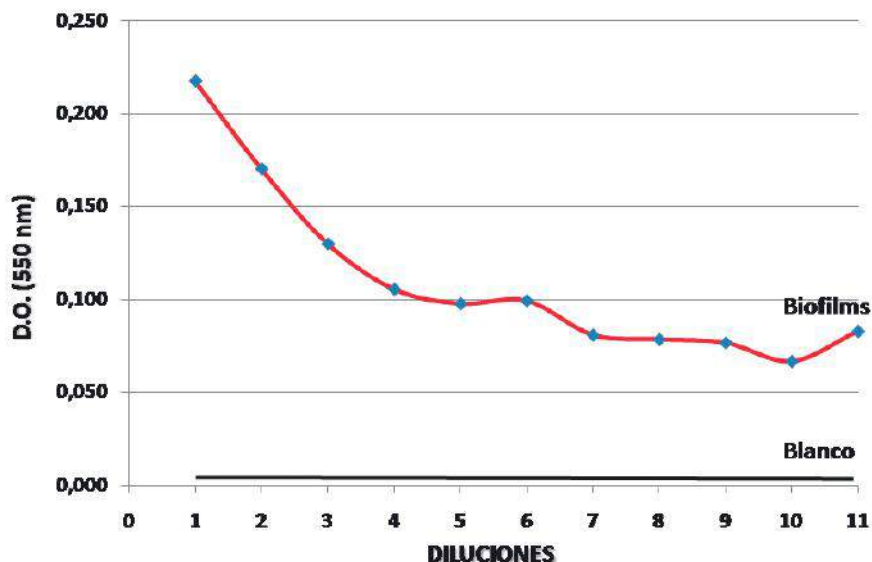


FIGURA 9. Cinética del desarrollo de biofilms en *Streptococcus mutans* ATCC 25175, frente a diferentes concentraciones del extracto de *Vitis vinifera* (uva) al término de las 24 horas.

IV. DISCUSIÓN

En la etiología del proceso carioso, participa una serie de factores, siendo el más relevante el desarrollo de la placa bacteriana; por este motivo, reducir la formación de biofilms sobre las superficies dentales, es un tema de suma importancia, lo cual a llevado a proponer el empleo de productos naturales que mermen la formación de biofilms (placa bacteriana), y de esta manera mejorar la salud bucal y tratar de evitar el desarrollo de caries dental.

Bajo el contexto anterior, la inhibición de la adhesión de microorganismos ha sido siempre una estrategia de interés para evitar algunas enfermedades producidas por algunas bacterias, dado que esta inhibición bloquea estéricamente a la bacteria y esta no se pueda adherir al tejido anfitrión; dejándose de lado el tradicional concepto del empleo de agentes bactericidas o bacteriostáticos como solución al problema y la subsecuente problemática que acarrea el empleo de los mismos (Park YK., 1998; Okubo S. *et.al.*, 1991; Toda M. *et.al.* 1992).

La propuesta del empleo de las semillas de *Annona*, fue con el propósito de determinar algún tipo de actividad en la inhibición durante la formación del biofilm de *Streptococcus mutans* bajo condiciones *in vitro*. En varios países latinoamericanos se lo emplea en medicina tradicional, y se le atribuyen numerosas propiedades medicinales, destacando su uso como infusión para tratar diarrea, disentería y gripe. La cocción de la corteza se recomienda contra el asma, y la flor hervida para el dolor de estómago. Otras características destacables que reporta son su acción antibacteriana, antiparasitaria, antiespasmódica, astringente, insecticida, sedativa, vasodilatadora y vermífuga. (Alonso, C. (1999).

Además de ello, se tiene conocimiento de la existencia de compuestos de comprobada actividad biológica en *Annona*, como las acetogeninas, las cuales son un grupos de sustancias conformadas por largas cadenas carbonadas C-32 o C-43 de ácidos grasos, que pueden estar combinados con una unidad 2-propanol en el C-2, y formar una lactona; las cuales presentan diferentes bioactividades, como antitumoral, inmunosupresiva, y antimicrobiana (Kim GS, *et.al.* 1998); asimismo, Vander y Vlietinck (Vander y Vlietinck, 1991), reportan el fraccionamiento de extractos activos de *Annona muricata*, que permiten la obtención de dos grupos de fracciones biodinámicas (AM3-II y AM3-III). Los ensayos para evaluar el potencial antimicrobiano de las fracciones AM3-II y AM3-III, permitieron detectar que la fracción AM3-III inhibe selectivamente el crecimiento de algunos microorganismos Gram positivos tales como *Staphylococcus aureus*; sin embargo, no presenta el mismo efecto sobre bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* (Vander y Vlietinck, 1991). Los datos obtenidos de estas pruebas indicaron que sólo la fracción AM-3 III presentó actividad antimicrobiana, inhibiendo aproximadamente el 90% del crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1000 µg/ml; no obstante, resulto negativa contra microorganismos Gram negativos.

En nuestro estudio, se detecta cierta actividad antimicrobiana, sobre todo a las concentraciones del 100 y 50% del extracto etanólico, tal como se describe en la figura 4, probablemente consecuencia de

los componentes antes descritos. Sin embargo, este crecimiento total es moderado y sostenido en el tiempo, deduciéndose que algún componente del extracto debe de interferir de alguna manera con el ciclo celular de las células bacterianas, al menos durante las 24 h propuestas para el ensayo. De otro lado, con el objeto de estimar el crecimiento de sólo células en estado planctónico, los resultados nos muestran que de igual forma existe un crecimiento moderado, con una cinética muy similar al hallado con el crecimiento total.

En cuanto a la posible inhibición en la formación de biofilms bacterianos, resultó paradójico demostrar que a concentraciones mayores (figura 6), en vez de existir inhibición, se posibilitó la formación de este, pudiendo existir varias explicaciones al respecto como la mayor concentración de nutrientes.

En cuanto al estudio realizado con el extracto etanólico de las pieles del fruto de *Vitis*, ha mostrado poseer una ligera actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* (figuras 7 y 8), principalmente durante la primera y segunda concentración, ubicándose posiblemente su concentración mínima inhibitoria (CMI) alrededor de la segunda y tercera concentración, tanto en la experiencia con el crecimiento total como en células en estado planctónico. Los antecedentes sostienen que son poseedores de componentes bacteriostáticos, quizás siendo este el principal motivo por el cual no se logra una recuperación plena del crecimiento en concentraciones menores; sin embargo, por otro lado, se sostiene que además se comporta como un inhibidor de la adhesión al vidrio, y en ese sentido nuestros resultados son contrarios (figura 9) a los hallados por Park en 1998 (Park Y.K., 1998).

Cabe señalar, que los resultados obtenidos son preliminares, y no son concluyentes sobre el efecto inhibidor del crecimiento y el desarrollo de biofilms, es necesario ampliar las experiencias ensayando nuevos sistemas de extracción, con nuevos solventes, y ampliar el número de especies bacterianas sobre las que se efectúen las evaluaciones.

V. CONCLUSIONES

1. Para ambos extractos etanólicos, procedentes de las semillas de *Annona muricata* y las pieles de los frutos de *Vitis vinifera*, se evidenció una ligera actividad antimicrobiana con las dos concentraciones mayores sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. De los extractos etanólicos ensayados, ninguno de ellos mostró actividad para inhibir el desarrollo de biofilms de *Streptococcus mutans* ATCC 25175; por el contrario, a concentraciones mayores hubo una promoción en el desarrollo de estos biofilms.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albala C, Vío del R. (1998). Transición nutricional en Chile. Rev Chil Nut.; 25(3):24-8.
2. Alonso C, Lara F, Esquivel B. (1999). Plantas medicinales. Composición, usos y actividad biológica. UNAM: México.
3. Camejo M. (1999). Sensibilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* a sanguinaria, compuesto fenólico y Clorhexidina. Acta Odontol Venez.; 37(2): 33-7.
4. Escobar F. (1994). Odontología pediátrica. Caracas: Amolca.
5. Gregory RL, Rahamanam, Avery DR. (1998). Effect at restorative treatment on mutans streptococci and IgA antibodies. Pediatr Dent.; 20(4): 273-7.
6. Joaquin F, Canseco J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. Bol Med Hosp Infant Mex; 58(10): 673-6.
7. Kim GS, Zeng L, Alali L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J. (1998). Muricoreacin and murihexocin C. monotetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. Phytochemistry 49(2): 565-71.
8. Liébana UJ. (1995). Microbiología oral. Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
9. Linossier A, Gajardo M, Olavarría J. (1996). Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. Scann Micros.; 10: 1005-114.
10. Loesche W.J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev.; 50:

353-80.

11. Okubo S, Toda M, Hara Y, Shinamura T. (1991). Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin. *Jpn J Bacteriol.*; 46: 509-14.
12. Palomer L. (2006). Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. *Rev Chil Pediatr* [online]. Feb. [citado 31 octubre 2006]; 77(1): 56-60.
13. Park YK. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* 36: 24-28.
14. Shi W, Jewett A, Nume WR. (1998). Rapid and quantitative detection of streptococcus mutans with species specific monoclonal antibodies. *Hybridoma* 17(4): 365-71.
15. Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic S. (2003). In vitro antimicrobial Activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 158: 353-357.
16. Stephen KW. (1993). Caries in young populations worldwide: In: Bowen WH & Tabak LA Editors. *Cariology for the nineties*. New York: University of Rochester Press; p. 37-50.
17. Tanzer J, Livingston J, Thompson A. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent. Educ.*; 65: 1028-37.
18. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Sukuki Y, Hara Y, Shinamura T. (1992). The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio Cholerae*. *J Microbiol Immunol.*; 36: 999-1001.
19. Vaananen MK, Markkanen MA, Tuovivien VJ, Kulla AM, Karinpaa AM, Luomalt EA, et al. (1994). Dental caries and mutans streptococci in relation to plasma ascorbic acid. *Scand J Dent. Res.*; 102(2): 103-8.
20. Vander B, Vlietinck, J; (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry*, 6: 47-67.
21. Velikova M, Bakova V, Sorkun K, Popova S, Kujumgiev A. (2001) Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and Bulgarian origin. *Mellifera* 1(1): 57-59.
22. Wahl M. (1989). Marine Epibiosis *Fouling and Antifouling*. *Marine Ecology Progress*, pp. 175-189.
23. Weyne S. (1991). *Operatoria dental de Baratieri Luis*. 2ª ed. Sao Paulo: Quintessence.
- 1.