

INHIBICIÓN DE *Streptococcus mutans* CON EXTRACTOS DE *Rubus ulmifolius*, *Passiflora mollissima* Y *Vaccinium floribundum*

INHIBITION OF *Streptococcus mutans* WITH EXTRACTS OF *Rubus ulmifolius*, *Passiflora mollissima* AND *Vaccinium floribundum*

Stalin Gustavo Santacruz Terán y Rudy Gissella Tagle González

Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, vía a San Mateo s/n, Manta, Ecuador

Email: stalin.santacruz@gmail.com

Información del Resumen artículo

Tipo de artículo:
Artículo original

Recibido:
05/08/2020

Aceptado:
27/11/2020

Licencia:
CC BY-NC-SA 4.0

Revista
ESPAMCIENCIA
11(2):75-79

DOI:
https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v11i2.220

Es conocido que el consumo excesivo de azúcares conlleva al desarrollo de caries dental y obesidad, entre otras enfermedades. Conociendo que algunos de los compuestos fenólicos tienen carácter antimicrobiano, en el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de mora (*Rubus ulmifolius*), taxo (*Passiflora mollissima*) y mortiño (*Vaccinium floribundum*) en concentraciones de 1, 2, 3% frente a *Streptococcus mutans*, microorganismo responsable del desarrollo de caries dental, mediante el método de difusión con discos. 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 h de 1,34, 1,42, y 1,57 cm y a las 48 h 1,31, 1,40 y 1,46 cm, respectivamente. Mortiño y taxo tuvieron igual actividad inhibitoria ($p < 0,05$). Los extractos con concentraciones diferentes mostraron que la concentración de 3% presentó una mayor zona de inhibición con respecto a 1 y 2%, siendo estas dos últimas estadísticamente iguales. Los resultados del análisis sensorial mostraron que la leche saborizada con mortiño tuvo mayor aceptación, 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 tiene alto poder inhibitorio frente a *S. mutans*.

Palabras clave: caries dental, actividad antimicrobiana, leche saborizada, poder inhibitorio

Abstract

It is known that excessive consumption of sugars leads to tooth decay and obesity, among other diseases. Some phenolic compounds have an antimicrobial character. In this study, the antimicrobial activity of blackberry (*Rubus ulmifolius*), taxa (*Passiflora mollissima*) and mortiño (*Vaccinium floribundum*) was evaluated *in vitro* in concentrations of 1, 2, 3% against *Streptococcus mutans*, a microorganism responsible for the development of dental caries. The method of diffusion with discs was used. The effect of fruit addition to whole milk provided by the School Feeding Program was evaluated by sensory analysis with the addition of taxo and mortiño at 1%. The results showed that blackberry, mortiño and taxo extracts presented an average inhibition halo at 24h of 1.34, 1.42, and 1.57 cm and at 48h of 1.31, 1.40 and 1.46 cm, respectively. Mortiño and taxo had equal inhibitory activity ($p < 0.05$). The extracts with different concentrations showed that the concentration of 3% presented a greater inhibition zone with respect to 1 and 2%, being these last two statistically equal. The results of the sensory analysis showed that the mortiño-flavored milk had the greatest acceptance, with a classification of "I like it very much" in a 5-point hedonic scale. In conclusion, mortiño is the recommended fruit to use as milk flavoring, added to the fact that it also has high inhibitory power against *S. mutans*.

Keywords: dental caries, antimicrobial activity, flavored milk, inhibitory power

INTRODUCCIÓN

La caries dental es uno de los padecimientos de salud más habituales en todo el mundo (GBDS, 2018). Según la OMS, la población más propensa a sufrir problemas son los niños de edad escolar, encontrándose que entre el 60% y el 90% de este grupo se ven afectados (Pérez-Domínguez *et al.*, 2010).

La 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 (Freire *et al.*, 2016). Dentro del coctel de microorganismos responsables de la caries dental destaca el *Streptococcus mutans* (Arreguín-Cano *et al.*, 2016).

Actualmente Ecuador a través de programas de alimentación escolar ofrece alimentos sólidos como galletas o granola y bebidas como leche saborizadas (PAE, 2017). En su información nutricional, la leche ofrecida por el programa de alimentación escolar (PAE) describe un contenido de 14 g de azúcar por cada 200 g de bebida. De acuerdo a este último valor no existe problema en el contenido de azúcar, sin embargo, hay que considerar el consumo de otros alimentos azucarados consumidos durante el día. El azúcar total consumido por un niño con el programa de alimentación escolar es de aproximadamente 24 gramos (barra de cereales 2,5 g, galletas 7 g, leche saborizada 14 g). La OMS recomienda una ingesta diaria de 50 g de azúcares en niños y 25 g si se desea obtener beneficios adicionales (Ruiz y Varela, 2017). Indudablemente, el azúcar total consumido por niños en edad escolar favorece el desarrollo de caries dentales (Duque de Estrada *et al.*, 2006; Cid *et al.*, 2008)

Además de su actividad antioxidante establecida, muchos compuestos fenólicos pueden exhibir una actividad antibacteriana significativa (Orhan *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2012). Dado que muchos extractos de plantas son ricos en compuestos fenólicos, esto es de particular interés para el desarrollo de alternativas naturales a los conservantes sintéticos en alimentos (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019), aplicaciones cosméticas (Kocevar y Lunder, 2018) y aplicaciones en medicina. Dentro de la odontología, Reyes *et al.* (2019a, 2019b) encontraron que los extractos de *Prunus salicifolia* y *Vaccinium floribundum* presentaron actividad inhibitoria contra *S. mutans*.

Los mecanismos de acción antibacteriana de los compuestos fenólicos aún no están completamente descifrados, pero se sabe que estos compuestos involucran muchos sitios de acción a nivel celular (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019). Varios autores explican esta actividad por la modificación de la permeabilidad de las membranas celulares, los cambios en diversas funciones intracelulares inducidos por la unión del hidrógeno de los compuestos fenólicos a las enzimas o por la modificación de la rigidez de la pared celular con pérdidas de integridad por

diferentes interacciones con la membrana celular. (Cushnie y Lamb, 2011).

Vasco (2009), mostró 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 posibles beneficios medicinales y funcionales.

Con base en la información previa, la presente investigación estudió el uso de extractos de mora, taxo y mortiño como inhibidores del desarrollo de *Streptococcus mutans*. Adicionalmente, se analizó la aceptabilidad de leches saborizadas preparadas con extractos de las tres frutas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La leche empleada en el estudio fue leche entera UHT del Programa de Alimentación Escolar. La mora y taxo fueron adquiridas en el mercado de la ciudad de Manta, mientras que el mortiño se obtuvo de un mercado la ciudad de Quito.

Las frutas fueron sometidas a un proceso de selección para retirar las frutas que presentaron daños físicos, así como cualquier impureza. Las frutas seleccionadas se lavaron con agua potable, para posteriormente desintegrar 250 g de fruta con ayuda de una licuadora doméstica (Oster SW194DT, Reino Unido). La pulpa desintegrada se filtró en una tela gabardina lisa 6 oz crudo (Telasxmetro, Argentina), eliminándose el material sólido. El material filtrado (extracto) se mezcló con leche entera para obtener porcentajes de extracto de 1, 2, 3% en la leche final (leche saborizada).

Análisis de inhibición *in vitro* de *Streptococcus mutans*

Se utilizó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2015). La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC35668 (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 h. Una vez activados los microorganismos en estudio, se preparó una suspensión bacteriana al 0,5 en la escala de Mc Farland (Santacruz and Castro, 2018), que representa una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC, misma que se inocularó en cajas Petri con agar sangre. Posteriormente, se colocó en las cajas Petri discos de papel filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro, que contenían 20 μ L de leche saborizada, previamente preparada en tres concentraciones más una

muestra control (leche no saborizada). Las placas inoculadas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 2 días, luego de lo cual se midió la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado.

Análisis de evaluación sensorial

Con base en los resultados del análisis de inhibición, se preparó leche saborizada de las frutas a concentración del 1%. Las leches saborizadas conjuntamente con la muestra control (leche no saborizada) se utilizaron en un análisis sensorial que permitió determinar la leche saborizada con mayor aceptación. Para ello se realizó una prueba de satisfacción con una escala hedónica de cinco puntos que fue de “me disgusta mucho” a “me gusta mucho”, misma que permitió establecer el nivel de agrado de las muestras (Gaytán-Andrade *et al.*, 2019). Para la prueba se contó con 40 panelistas no entrenados.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial (3x3+1), utilizando como control una leche entera no saborizada. Las variables independientes fueron el tipo de fruta, en 3 niveles, (mora, mortiño y taxo) y la concentración del extracto de fruta, en 3 niveles (1, 2 y 3%). La variable dependiente fue la zona de inhibición de *S. mutans*.

Análisis estadístico

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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de inhibición *in vitro* de *Streptococcus mutans*

El cuadro 1 muestra que la muestra control no presentó inhibición, mientras que la leche con 3% de extracto de fruta fue estadísticamente diferente y presentó mayor inhibición (diámetro de 1,58 cm) que las muestras con otras concentraciones de fruta, luego de 24 h de estudio ($p < 0,05$). El mismo comportamiento se observó a las 48 h. No existió diferencia estadística entre las concentraciones de 1 y 2%. Análisis de inhibición de *S. mutans* fueron realizados por Reyes *et al.* (2019a), quienes encontraron zonas de inhibición entre 0,83 y 1,73 cm por acción de extractos de mortiño y Reyes *et al.* (2019b) zonas de 0,88 cm, por acción de extracto de mortiño deshidratado. Dichos valores son similares a los obtenidos en el presente trabajo.

Cuadro 1. Comparación de medias de la zona de inhibición de *S. mutans* luego de 24 y 48 h frente extractos de mora, mortiño y mora en concentraciones de 1, 2 y 3%

Concentración (%)	Zona de inhibición	
	24 h (cm)	48 h (cm)
0	0,00 ^A	0,00 ^A
1	1,37 ^B	1,32 ^B
2	1,39 ^B	1,35 ^B
3	1,58 ^C	1,51 ^C

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

Los resultados de inhibición respecto al tipo de fruta mostraron que no existió diferencia en las zonas de inhibición luego de 24 y 48 h de incubación. El control mostró diferencia con todos los tratamientos ($p < 0,05$). Las zonas de inhibición de mora y mortiño fueron iguales, con medias de 1,34 y 1,42 cm, respectivamente, luego de 24 h de incubación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias de la zona de inhibición del *S. mutans* luego de 24 y 48 h frente al tipo de fruta

Fruta	Zona de inhibición	
	24 h (cm)	48 h (cm)
Control	0,00 ^A	0,00 ^A
Mora	1,34 ^B	1,31 ^B
Mortiño	1,42 ^{B, C}	1,40 ^{B, C}
Taxo	1,57 ^C	1,46 ^C

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

Los resultados mostraron mayores halos de inhibición para taxo y mortiño 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 (2009) ubica al mortiño y al taxo como frutas con alto contenido de compuestos fenólicos. Posiblemente la presencia de flavonoides (Rodríguez *et al.*, 2017) conjuntamente con la alta concentración de compuestos fenólicos podrían contribuir con el poder inhibitorio de *S. mutans*.

Análisis de evaluación sensorial

Los resultados de inhibición *in vitro*, mostraron que las frutas con mayor efecto inhibitorio frente a *S. mutans* fueron taxo y mortiño. La concentración de extracto escogida, con mayor poder inhibitorio sobre la bacteria, para saborizar la leche, fue del 1%, esto con el objeto de no modificar la formulación original de la leche del PAE.

Los resultados de la prueba de comparación de medias mostraron que las tres muestras presentaron diferencias significativas entre sí (Cuadro 3). La muestra de mortiño presentó una media de 4,32, que corresponde a “me gusta moderadamente”. La muestra control (no saborizada) presentó una media de 3,17 que equivale “me es

indiferente” y la muestra saborizada con taxo obtuvo una media de 2,93 que correspondió a “me disgusta un poco”. Con base en los resultados se pudo concluir que a pesar de que el taxo tuvo el mayor poder de inhibición frente a *S. mutans*, no se recomienda su uso como saborizante de leche por su bajo nivel de agrado.

Cuadro 3. Comparación de medias de evaluación sensorial de leche saborizada con extractos de taxo y mora en concentración de 1%

Bebida	Calificación
Leche + taxo	2,93 ^A
Leche control	4,17 ^B
Leche + mortiño	4,32 ^C

Medias con una letra superíndice común no son significativamente diferentes (p<0,05)

CONCLUSIONES

Los análisis microbiológicos *in vitro* mostraron que la fruta que presentó mayor poder inhibitorio frente a *S. mutans* fue el taxo, seguida del mortiño y finalmente la mora. Las concentraciones de extracto de fruta de 1 y 2% presentaron un igual poder inhibitorio y a la vez menor a 13%. El análisis de aceptabilidad dio como resultado que la mezcla leche-mortiño tuvo la mayor aceptación, con una calificación de “me gusta moderadamente”.

LITERATURA CITADA

Arreguín-Cano, J., Gerónimo, C., Bermúdez, C., Ostia, M., Ventura, J., Álvarez, C., González, Z. y Gutiérrez-Venegas, G. 2016. Caries dental y microorganismos asociados a la caries en la saliva de los alumnos del primer año de la Facultad de Odontología, UNAM. *Revista Odontológica Mexicana* 20(2):77-81

Bouarab-Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., and Oulahal, N. 2019. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99:1457-1474.

Cid, M., Martínez, I. y Morales, J. 2008. Ingestión de azúcares en niños menores de 1 año. *Revista Médica Electrónica* 28(1):113-116.

Cushnie, T. and Lamb, A. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38:99–107.

Duque de Estrada, J., Pérez, J. y Hidalgo, I. 2006. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatología* 43(1).

Freire, A., Farfán, A. y Chuquimarca, B. 2016. Elevado consumo de azúcares y caries asociados a cepillado

dental en niños de Centros Infantiles del Buen Vivir (CIBVs) de Quito. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)* 41(1):21-30

Gaytán-Andrade, J., Salas, S., López, L., Cobos, P. y Silva, B. 2019. Desarrollo y Evaluación Sensorial De Un Postre de Gelatina Funcional Del Fruto Rojo de *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber) Buxbaum. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 4:576-580

GBDS (Global Burden of Disease Study). 2018. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392: 1789–8583

Kocevar Glavac, N., and Lunder, M. 2018. Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. *International Journal of Cosmetic Science* 40: 276–284.

Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C. and Li, J. 2012. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25: 550–554.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2015. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* 35:17-22.

Orhan, D., Özçelik, B., Özgen, S. and Ergun, F. 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research* 165: 496–500.

PAE (Programa de Alimentación Escolar). 2017. Ministerio de Inclusión Económica y Social, Quito, Ecuador.

Pérez-Domínguez, J., González-García, A., Niebla-Fuentes, M. y Ascencio-Montiel, I. 2010. Encuesta de prevalencia de caries dental en niños y adolescentes *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 48(1): 25-29

Reyes, Y., Cruz, V., Castro, M., Santacruz, S., Villacres, C. y Armas, A. 2019a. Efecto antibacteriano de extractos de *Prunus salicifolia* (capulí) y *Vaccinium floribundum* (mortiño) sobre cepas de *Streptococcus mutans*: Estudio *in vitro*. *KIRU* 16(1): 14-18.

Reyes, Y., Santacruz, S., Castro, M., Villacres, C., Chávez, M. y Armas, A. 2019b. Efecto antibacteriano y antioxidante de frutos rojos ecuatorianos sobre *Streptococcus mutans*: estudio *in vitro*. *Odontología Vital* 31: 23-30.

Rodríguez, C., Zarate, A. y Sánchez, L. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente

a patógenos de importancia clínica en Colombia.
NOVA 15(27): 119-129

Ruiz, E. y Varela-Moreiras, G. 2017. Adecuación de la ingesta de azúcares totales y añadidos en la dieta española a las recomendaciones: estudio ANIBES. *Nutrición Hospitalaria* 34: 45-52.

Santacruz, S. and Castro, M. 2018. Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT Food Science and Technology* 93: 570-572.

Vasco, C. 2009. Phenolic Compounds in Ecuadorian Fruits. Ph.D. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.