

EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Psidium guajava* (guayaba) y *Medicago sativa* (alfalfa) SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

ANTIBACTERIAL EFFECT *in vitro* OF THE ALCOHOLIC EXTRACT OF *Psidium guajava* (guayaba) and *Medicago sativa* (alfalfa) ON *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Chero Nepo Diego Armando^{1b}, Miguel Ángel Ruiz Barrueto^{2ab}

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto de antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Material y métodos:** Investigación cuantitativa con diseño experimental de estímulo creciente. Se emplearon 20 concentraciones volumétricas de cada extracto de 1 - 20 mg/ml, un control positivo que fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo que fue etanol absoluto. Para evaluar el efecto antibacteriano de ambos extractos alcohólicos se utilizó el método de difusión en disco mediante el diámetro de los halos de inhibición y para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método de microdilución en caldo. **Resultados:** Se determinó que tanto la CMI como la CMB fue < 1 mg/ml. La mayor inhibición se encontró con el extracto alcohólico de *Psidium guajava* y fue a la concentración de 18 mg/ml obteniéndose un halo superior a los 28 mm. En el caso del extracto alcohólico de *Medicago sativa* la mayor inhibición se obtuvo a la concentración de 9 mg/ml pero dicha inhibición no fue significativa. **Conclusión:** Se concluye que no existe efecto antibacteriano sinérgico entre los extractos alcohólicos de las hojas de *Medicago sativa* y *Psidium guajava* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 cuyos halos de inhibición obtenidos fueron menores al control negativo.

Palabras Clave: Antibacteriano, *Streptococcus mutans*, *Psidium guajava*, *Medicago sativa*. (**Fuente:** DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro* antibacterial effect of the alcoholic extract of *Psidium guajava* and *Medicago sativa* on *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Methods:** Quantitative research with experimental design of increasing stimulus. Twenty volumetric concentrations of each extract of 1-20 mg / ml were used, a positive control which was chlorhexidine 0.12% and the negative control which was absolute ethanol. In order to evaluate the antibacterial effect of both alcoholic extracts, the disc diffusion method was used by the diameter of the inhibition halos and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CMB) the microdilution method was used in broth. **Results:** Both CMI and CMB were found to be <1 mg / ml. The highest inhibition was found with the alcoholic extract of *Psidium guajava* and was at the concentration of 18 mg / ml obtaining a halo superior to 28 mm. In the case of the alcoholic extract of *Medicago sativa* the highest inhibition was obtained at the concentration of 9 mg / ml, but such inhibition was not significant. **Conclusion:** It is concluded that there is no synergistic antibacterial effect between the alcoholic extracts of *Medicago sativa* and *Psidium guajava* leaves on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 whose inhibition halos obtained were lower than the negative control.

Key Words: Anti-Bacterial, *Streptococcus mutans*, *Psidium guajava*, *Medicago sativa*. (**Source:** MeSH NLM)

¹Cirujano Dentista

²Biólogo Microbiólogo

^aMaestro en Ciencias mención Microbiología Clínica

^bEscuela Profesional de Estomatología, Universidad Señor de Sipán

1. Introducción

La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial que se caracteriza por un biodinamismo molecular en el cual se genera una interacción directa entre microorganismos y el órgano dental. Es una de las patologías de la cavidad oral más prevalentes en el mundo siendo una de las principales causas de la destrucción y pérdida dentaria. Esta afección ocupa el segundo lugar en la tabla de morbilidad general a nivel nacional y la tercera ubicación en la etapa de la niñez con un 9,1%, solamente superada por las infecciones de las vías respiratorias agudas y las infecciones intestinales (1).

Streptococcus mutans es una de las bacterias que constituye la primera causa de caries dental y de infecciones graves por estreptococos del grupo viridans. Se ha establecido que el 90% de las personas, en las ciudades industrializadas son afectadas por infecciones bucodentales de origen bacteriano (2). La Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que las enfermedades bucodentales, como la caries dental y la enfermedad periodontal constituyen problemas de salud pública que afectan a los países industrializados y cada vez con mayor frecuencia a los países en desarrollo, en especial a las comunidades más pobres (3).

La Salud Bucal en el Perú es considerada un grave problema de Salud Pública, por lo que es necesario un abordaje integral del problema, aplicando medidas eficaces de promoción y prevención de la salud bucal⁴. Según un Estudio Epidemiológico a nivel nacional realizado los últimos años la prevalencia de caries dental era de 90,4% debido a esto la Organización Panamericana de la Salud (OPS) consideró al Perú en un país en estado de emergencia con respecto a salud oral (5). El MINSA ha establecido que en el Perú de cada 100 personas adultas 98 presentan algún diente cariado.

Actualmente existe un interés muy grande por investigar nuevas formas terapéuticas para combatir las afecciones orales pero la mayoría de estudios es a nivel internacional y están relacionadas con el uso de extractos vegetales y otras sustancias inocuas para los tejidos orales. Como bien sabemos, las plantas han sido utilizadas por la humanidad en todo el mundo desde tiempos remotos para controlar e incluso curar afecciones causadas por microorganismos (6).

En ese sentido investigaciones actuales han reportado que las plantas presentan principios activos con propiedades farmacológicas, las cuales pueden ser utilizadas para el control de algunos microorganismos. Entre estas plantas encontramos a la alfalfa y la guayaba, cuyas investigaciones precedentes informan que han sido utilizadas en el control de microorganismos gram negativos (7), por lo que esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y de *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, microorganismo oral, gran positivo importante en el desarrollo de caries dental.

2. Material y métodos

Se realizó un estudio experimental longitudinal prospectivo. La población estuvo constituida por un cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, reactivada en agar sangre de carnero al 5% en anaerobiosis y la muestra conformada por 100 µL de una suspensión bacteriana a partir de dicha cepa. La Estandarización del Inoculo se realizó por espectrofotometría. La suspensión bacteriana obtuvo una absorbancia de 0.9 a una $\gamma = 600$ nm equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (7).

Para la preparación de ambos extractos se recolectaron hojas de *Psidium guajava* y de *Medicago sativa* las que fueron secadas en estufa y maceradas en una mezcla hidroalcohólica de metanol durante siete días después de los cuales se realizó la extracción en un Rotavapor Marca Buchi, Modelo R215 (8). Los ensayos consistieron en 20 concentraciones volumétricas de cada extracto (de

a 1 a 20 mg/mL), un control positivo que fue clorhexidina al 0,12% y un control negativo que fue la solución solvente (etanol al 80%).

La evaluación de la susceptibilidad antibacteriana se realizó mediante tres métodos estandarizados por el CLSI (*Clinical and laboratory Standards institute*). El método de difusión en placa con discos (efecto antibacteriano), el método de microdilución con el cual se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada extracto y el método de siembra en superficie para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (8).

En el método de difusión en disco para la determinación del efecto antibacteriano se procedió a sembrar el inóculo estandarizado con ayuda de un hispo estéril sobre la superficie de placas de Petri con gar Mueller Hinton. Posteriormente con ayuda de una pinza estéril se incorporaron discos de papel de filtro sobre la superficie de dichas placas sembradas. Tres discos equidistantes por placa, a un disco se le agregó con ayuda de una micropipeta 25 μ L de la concentración de los extractos evaluados, al segundo disco se le incorporó 25 μ L del control positivo Gluconato de clorhexidina y al tercer disco se le incorporó 25 μ L del control negativo que fue etanol al 80%. Los discos y las placas fueron rotuladas inmediatamente después de incorporadas las soluciones a evaluar. Las placas fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis durante 48 horas. Los resultados en este método se obtuvieron mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición en aquellas concentraciones donde se formaron y se expresaron en milímetro.

La determinación de la CMI y CMB se realizó por el método de microdilución seguido del método de siembra en superficie para el recuento de UFC. El método de microdilución consistió en la utilización de una microplaca de 96 pocillos. En la serie horizontal de 12 pocillos se incorporó a los diez primeros las concentraciones de cada extracto a evaluar (de 1mg/ml hasta 10 mg/ml) y en otra placa las otras concentraciones (de 11mg/ml hasta 20 mg/mL). Los pocillos 11 y 12 fueron utilizados para el control positivo y control negativo. Se incorporó a cada pocillo 100 μ L del inóculo bacteriano estandarizado y 100 μ L de la concentración del extracto a evaluar, así como de las soluciones que actuaron como controles positivo y negativo. Los 8 pocillos verticales de la microplaca constituyeron duplicados de cada ensayo. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas en anaerobiosis después de las cuales se realizó la lectura de resultados. Se consideró como CMI aquel pocillo de la microplaca donde no se observó crecimiento bacteriano (no hubo formación de botón ni turbidez). La CMB se determinó sembrando con un asa estéril 100 μ L de solución del pocillo donde no se observó crecimiento (CMI) y los pocillos siguientes en placas con agar Mueller Hinton. La siembra de la muestra se realizó en superficie con asa de Drigalsky. Los resultados se expresaron en UFC/mL.

3. Resultados

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que *Streptococcus mutans* es sensible al extracto alcohólico de *Psidium guajava* a concentración de 18 mg/mL pues a esa concentración se obtuvo el mayor halo de inhibición.

Res pecto al extracto alcohólico de *Medicago sativa* los resultados demuestran que el *Streptococcus mutans* fue sensible a la concentración de 9 mg/ml pues a esa concentración se obtuvo el mayor halo de inhibición.

El promedio de los halos de inhibición de la mezcla de los extractos hidroalcohólico de *Psidium guajava* (18mg/ml) y de *Medicago sativa* (9 mg/ml) fue de 18.125 mm, mientras que los halos de inhibición producidos por el *gold standard* Gluconato de Clorexidina al 0.12 % fueron en promedio de 23.125 mm para *Streptococcus mutans* (Figura. 1, 2, 3, 4).

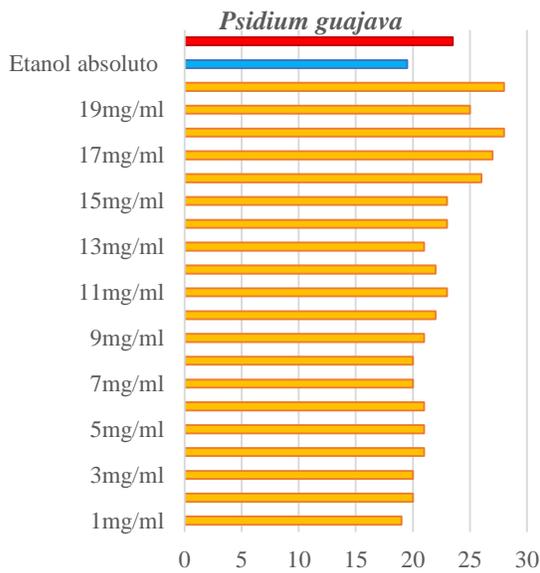


Figura 1. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol al 80%).

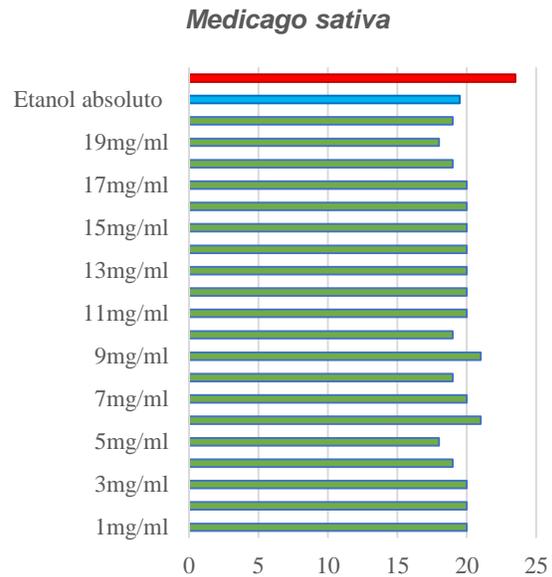


Figura 2. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Medicago sativa* y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol al 80%).

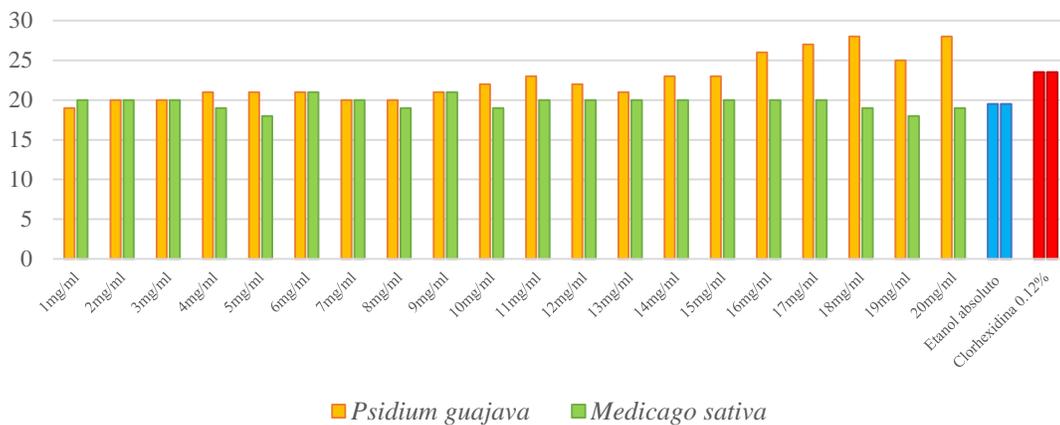


Figura 3. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 10 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y de *Medicago sativa* y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto).

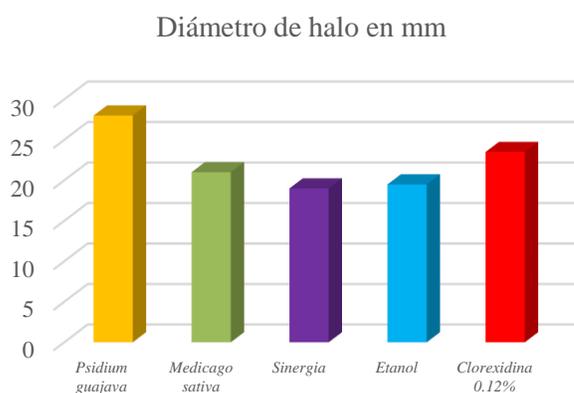


Figura 4. Comparación de los promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a la concentración de mayor eficiencia del extracto de *Psidium guajava*, de *Medicago sativa*, de la sinergia y de los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto).

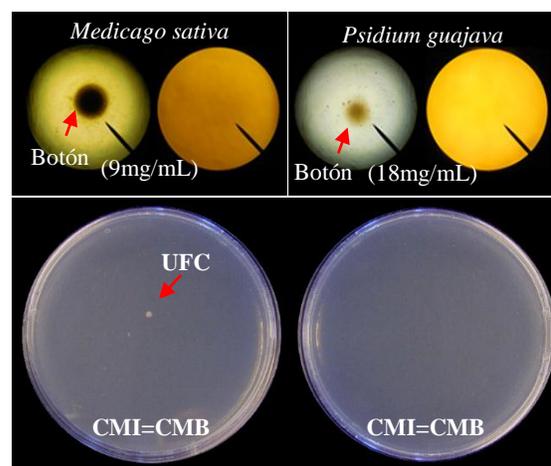


Figura 5. Determinación de la CMI y CMB mediante el método de microdilución del extracto alcohólico de *Psidium guajava* (18 mg/mL) y de *Medicago sativa* (9 mg/mL) sobre *Streptococcus*

4. Discusión

Shital Ch. et al., evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de varios extractos de hojas de *Medicago sativa* contra varias bacterias importancia clínica humana (9). La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de difusión en y los resultados demostraron que el extracto metanólico de las hojas *Medicago sativa* tenía actividad antibacteriana sobre bacterias gram positivas y gram negativas (5). Estos resultados tienen relación con los obtenidos en la presente investigación, porque se logró determinar que el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* produjo efecto tipo bactericida sobre *Streptococcus mutans*. Esto se pudo comprobar por la formación de halos de inhibición formados alrededor de los discos con las diferentes concentraciones del extracto. Cabe indicar que a pesar que se observa inhibición esta no logró superar a la sustancia utilizada como control positivo que fue el gluconato de clorhexidina al 0.12%.

Martinez et al., y Nelce et al., evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) Utilizaron el método de difusión en agar (10,11). Los resultados mostraron que la inhibición bacteriana sobre microorganismos gram positivos se debió la presencia de taninos, sustancia que le otorga una coloración oscura al extracto y es un principio activos presentes en las hojas (6). Estos resultados muestran relación directa con la presente investigación, principalmente porque *Streptococcus mutan* es una bacteria gram positiva, en segundo lugar porque los halos de inhibición obtenidos con las diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* fueron los de mayor diámetro, superando en un 10% aproximadamente al obtenido con el control gluconato de clorhexidina al 0.12%.

5. Conclusiones

- Se concluye que ambos extractos alcohólico tienen efecto bactericida *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Se concluye que el extracto alcohólico de las hojas de *Psidium guajava* “guayaba” tiene un efecto bactericida sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a concentración de 18 mg/mL. por lo que es un resultado significativo debido a que superó al control positivo que fue Gluconato de clorhexidina al 0.12%.
- Se concluye que el extracto alcohólico de las hojas de *Medicago sativa* “alfalfa” tiene un efecto bactericida sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a concentración de 9 mg/mL. Sin embargo no es significativo debido a que no superó el control positivo.
- se concluye que no existe sinergia entre la mezcla de los extractos alcohólicos de *Medicago sativa* “alfalfa” y *Psidium guajava* “guayaba” sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El efecto fue menor que el control negativo.

6. Referencias bibliográficas

- 1 Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. Streptococcus mutans y caries dental. Rev. CES Odont. 2013; 26(1) 44-56. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
- 2 Velásquez-Vergara O, Elías-Podestá M. Adquisición temprana de Streptococcus mutans y caries dental. Rev. Dental Tribune Hispanic & Latin America. 2014. Disponible en: http://www.dentaltribune.com/htdocs/uploads/printarchive/editions/c7a2ce4398d077cd9d8602b121c65984_22-26.pdf
- 3 El Desafío de las Enfermedades Bucodentales – Una llamada a la acción global. Atlas de Salud Bucodental. 2ª ed. Ginebra: Federación Dental Internacional (FDI); 2015. Disponible en: http://www.fdiworldental.org/media/84768/book_spreads_oh2_spanish.pdf
- 4 Ministerio de salud, Gobierno del Perú [Internet]. Salud Bucal. Lima, Perú. Ministerio de Salud (MINSA) [Citado el 23 de ene. del 2016]. Disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13
- 5 Espinoza-Solano M, León-Manco R. Prevalencia y experiencia de caries dental en estudiantes según facultades de una Universidad Particular Peruana. Rev Estomatol Herediana. 2015 Jul-Set;25(3):187-193. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/reh/v25n3/a03v25n3.pdf>
- 6 Bipul B, Kimberly R, Fredrick M, Dwayne D, Anand Y. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. (2013). Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2013/746165/>
- 7 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. USA2010. Disponible en: <http://clsi.org/blog/2015/01/08/clsi-publishes-new-antimicrobial-susceptibility-testing-standards/>
- 8 Mindy J. Perilla. Et al. 2003. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. WHO/CDS/CSR/RMD. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO_CDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf
- 9 Shital Ch, Ravindra S, Kavita S, Vishal B. Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Medicago sativa* Leaves. 2015(3).

- 10 Martínez, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (GUAYABA). Rev Cubana de Plant Med 1997; 2(1): 12-14. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol2_1_97/pla03197.pdf
- 11 Nelce M, Mahendradatta M, Laga A, Djide N. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guajava L) On Pathogens Microbial. International journal of scientific & technology guava leaves (psidium research 2014 (3). Disponible : <http://www.ijstr.org/final-print/jan2014/Antimicrobial-Activities-Of-Tannins-Extract-From-Guava-Leaves-psidium-Guajava-L-On-Pathogens-Microbial.pdf>

Correspondencia:

Miguel Ángel Ruiz Barrueto
Correo electrónico: maruizbar@gmail.com

Fecha de recepción: 18 setiembre 2016

Fecha de aceptación: 20 octubre 2016