



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Odontopediatría



**“ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL
EXTRACTO DE TÉ VERDE Y EXTRACTO DE ARÁNDANO EN
STREPTOCOCCUS MUTANS”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la
Especialidad en Odontopediatría

Presenta:

C.D. Iris Bernal Guillermo

Dirigido por:

C.D.E.O. Laura Adriana Servín Maxemín

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Junio 2021

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio comparativo in vitro del efecto
antimicrobiano del extracto de té verde y extracto de
arándano en *Streptococcus mutans*

por

Iris Bernal Guillermo

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: MEESC-284063



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Odontopediatría



“ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL
EXTRACTO DE TÉ VERDE Y EXTRACTO DE ARÁNDANO EN
STREPTOCOCCUS MUTANS”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la
Especialidad en Odontopediatría

Presenta:

C.D. Iris Bernal Guillermo

Dirigido por:

C.D.E.O. Laura Adriana Servín Maxemín

C.D.E.O. Laura Adriana Servín Maxemín
Presidente

C.D.E.O. Adriana Vázquez Alba
Secretario

C.D.E.O. Laura Celeste Herrera Alaníz
Vocal

L.O.E.O. Ana Liz Yáñez Gutiérrez
Suplente

Dr. Guillermo Ortiz Villagomez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio 2021
México

RESUMEN

Introducción: Actualmente se han lanzado diversos agentes naturales a base de extractos o enjuagues demostrando su eficacia terapéutica en la caries dental. El té verde y el arándano se han usado tradicionalmente como remedios caseros, pero poco son los estudios ante el *Streptococcus mutans*.

Objetivo: Evaluar y comparar la eficacia antimicrobiana del arándano y el té verde en cajas de agar inoculadas con *Streptococcus mutans*.

Material y métodos: Estudio experimental in vitro. Un total de 10 cajas Petri con agar tripticasa de soya, inoculadas con *Streptococcus mutans*, y con la aplicación de sensidiscos impregnados cada uno con extracto de arándano al 25%, extracto de té verde al 0.5%, digluconato de clorhexidina al 0.12% y agua bidestilada. Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se sometieron a prueba ANOVA, así como la comparación múltiple de Tukey Post Hoc.

Resultados: Los resultados del estudio indican que hubo una reducción estadísticamente significativa entre el halo de inhibición del extracto de té verde y el digluconato de clorhexidina, así como entre el extracto de arándano y el digluconato de clorhexidina frente al *Streptococcus mutans* ($P < 0.0001$), pero no hay diferencia estadísticamente significativa entre el té verde y el extracto de arándano.

Conclusiones: Por lo tanto, nuestro estudio demostró que el extracto de té verde al 0.5% y el extracto de arándano al 25% son eficaces contra *Streptococcus mutans*. Pueden usarse como complemento a los enjuagues bucales ya existentes.

Palabras clave: Extracto, té verde, arándano, *Streptococcus mutans*, caries dental.

SUMMARY

Introduction: Currently, various natural agents based on extracts or rinses have been launched, demonstrating their therapeutic efficacy in dental caries. Green tea and cranberry have traditionally been used as home remedies, but there are few studies on *Streptococcus mutans*.

Objective: Evaluate and compare the antimicrobial efficacy of cranberry and green tea in agar boxes inoculated with *Streptococcus mutans*.

Material and methods: Experimental in vitro study. A total of 10 Petri dishes with trypticase soy agar, inoculated with *Streptococcus mutans*, and with the application of sensidisks each impregnated with 25% cranberry extract, 0.5% green tea extract, 0.12% chlorhexidine digluconate and water double distilled. Data were statistically analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test and ANOVA, as well as the Tukey Post Hoc multiple comparison.

Results: The results of the study indicate that there was a statistically significant reduction between the inhibition halo of green tea extract and chlorhexidine digluconate, as well as between cranberry extract and chlorhexidine digluconate against *Streptococcus mutans* ($P < 0.0001$), but there is no statistically significant difference between green tea and cranberry extracts.

Conclusions: Therefore, our study showed that 0.5% green tea extract and 25% cranberry extract are effective against *Streptococcus mutans*. They can be used as a complement to existing mouthwashes.

Keywords: Extract, green tea, cranberry, *Streptococcus mutans*, dental caries.

DEDICATORIAS

A mis padres, por todo el apoyo brindado siempre, por haberme impulsado y llevado por el camino correcto cuando más lo necesitaba, por dedicarme siempre tiempo y amor, papi y mami sé lo mucho que se han esforzado para llevarnos a mis hermanas y a mí hasta donde estamos ahora. No me alcanzan las palabras para agradecerles el estar ahí siempre.

A mis hermanas, Tania y Heidy por estar conmigo siempre, somos un equipo y espero algún día poder ser su fuente de inspiración como ustedes lo son para mí. Gracias por ser mis amigas y por alentarme en la realización de la especialidad.

A mis amigos y hermanos del posgrado, por haberme ayudado a crecer como persona y como profesional, porque el camino no hubiera sido perfecto sin ustedes. Por todas las anécdotas los llevo a todos en mi corazón y en mis pensamientos como lo mejor que me ha pasado hasta ahora en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez por todo su apoyo, tiempo, disposición y ayuda brindada para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. En C. Guillermo Ortiz Villagomez por haberme abierto las puertas de la especialidad y siempre haberme orientado en este trayecto, pero sobre todo por su confianza depositada en mí.

A la Dra. Laura Adriana Servín Maxemín por haber sido mi colaboradora y **a los miembros de mi jurado** por haberme apoyado con la revisión de esta tesis y por haberme brindado su tiempo durante el proceso.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por haberme adoptado en mi estancia durante el posgrado, por haberme permitido lograr uno de mis más grandes sueños que fue la especialización.

Orgullosamente 100% UAQ.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	8
III. Fundamentación teórica	12
IV. Hipótesis	13
V. Objetivos	14
V.1 General	14
V.2 Específicos	14
VI. Material y métodos	15
VI.1 Tipo de investigación	15
VI.2 Población o unidad de análisis	15
VI.3 Muestra y tipo de muestra	15
VI. Técnicas	16
VI. Procedimientos	16
VII. Resultados	22
VIII. Discusión	24
IX. Conclusiones	26
X. Propuestas	27
XI. Bibliografía	28
XII. Anexos	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
VI.1	Tabla de datos Excel	31

I. Introducción

Se ha estimado que el cuerpo humano está formado por millones de células, de las cuales solo el 90% son los microorganismos que forman la flora residente del huésped. La boca está colonizada por una amplia gama de estos microorganismos, pues se calcula que existen más de 750 especies de bacterias que habitan en la cavidad oral humana (Marsh, 2019), pero solo una pequeña fracción de ellas se atribuye a causar enfermedades relacionadas con la placa dentobacteriana o la caries. Uno de los componentes integrales de una buena salud general es una buena salud oral (Anantharaj, 2008). La dieta y un estilo de vida saludable son las mejores armas para combatir las enfermedades, por lo tanto, se puede decir que la dieta y el estilo de vida de un individuo se han estudiado ampliamente (Higdon et al., 2017).

La caries dental es una enfermedad prevenible, transmisible, multifactorial localizada que resulta de la interacción entre el huésped, la dieta y la microflora en la superficie del diente durante un período de tiempo, lo que resulta en la cavitación de los restos inorgánicos del esmalte y la dentina (Zafar et al., 2017).

Las bacterias relacionadas en la etiología de la caries involucran bacterias gramnegativas como son *Streptococcus mutans* (por su aparición), *Lactobacilli spp* y *Streptococcus sobrinus* (por su avance) (Loesche, 2007).

El uso del agente antimicrobiano para limitar el crecimiento de microorganismos cariogénicos y prevenir la caries dental está garantizado. Se encontró que los enjuagues bucales son uno de los sistemas de administración seguros y efectivos como agente antimicrobiano y antiplaca. Estos enjuagues bucales son capaces de inhibir la adhesión bacteriana, la colonización y la actividad metabólica que finalmente afecta el crecimiento bacteriano (Rao, 2014).

Entre los agentes terapéuticos utilizados en los enjuagues bucales, la clorhexidina es el "estándar de oro" o control positivo para la comparación con otras sustancias

debido a su eficacia probada (Lakade et al., 2014), sin embargo existen reportes de que la clorhexidina mancha el esmalte y presenta toxicidad.

La acción antibacteriana de la clorhexidina se basa en su adsorción sobre superficies bacterianas. A bajas concentraciones, el efecto bacteriostático se basa en la alteración de las funciones de las células bacterianas, las enzimas y los receptores celulares, y en altas concentraciones, la clorhexidina causa precipitación o coagulación citoplasmática. Además, inhibe la acción de la glicosiltransferasa, la enzima responsable de la síntesis de polisacáridos, favorece la acumulación de bacterias en la superficie dental, y tiene efectos sobre el transporte de azúcar y la producción de ácido en las bacterias orales (Vale et al., 2014).

Otro enfoque novedoso recomendado para la prevención de caries es usar preparaciones combinadas de diferentes agentes terapéuticos. El uso de un enjuague bucal que contenga fluoruro y clorhexidina también ha demostrado efectos beneficiosos para reducir el desarrollo de nuevas lesiones de caries (Malhotra, 2011).

Para evitar los inconvenientes de los productos químicos, se han lanzado diversos agentes naturales y herbales como enjuagues bucales, los cuales pueden tener usos terapéuticos potenciales en medicina y odontología. De los diversos productos a base de hierbas que se describen en la literatura científica, las hierbas como el té verde (*Camellia sinensis*), el arándano (*Vaccinium macrocarpon*), entre otros se han usado tradicionalmente en remedios caseros efectivos. Hay una demanda creciente para el uso de plantas medicinales que tienen propiedades antibacterianas (Thomas et al., 2015).

Los polifenoles, son cualquier sustancia química encontrada en ciertas plantas, incluidas las hojas de té verde y el arándano, caracterizadas por la presencia de al menos, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (pueden estar presentes otros sustituyentes). Se clasifican en aproximadamente 15 grupos principales, y de

esos grupos, la familia de los flavonoides contiene la mayor variedad de compuestos que muestran actividades farmacológicas (Higdon et al., 2017).

La estructura básica de un flavonoide consiste en dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos, formando un anillo heterocíclico (Duarte et al., 2011).

Los polifenoles son uno de los grupos más comunes y generalizados de sustancias producidas en plantas y se sabe desde hace mucho tiempo que tienen una amplia gama de actividades que promueven la salud, incluida la actividad antimicrobiana (Tapiero et al., 2002). Varios estudios in vivo e in vitro han demostrado que los polifenoles pueden interferir selectivamente con rasgos de virulencia específicos de *Streptococcus mutans*, evitando la adherencia a las superficies de los dientes e inhibiendo las enzimas GTF, sin tener un efecto marcado sobre la viabilidad bacteriana (Gregoire et al., 2007).

El té, después del agua, es la bebida más consumida en todo el mundo, con un consumo per cápita de 120ml/día (Mckay et al., 2017). El té crece principalmente en las regiones tropicales y templadas de Asia, que incluyen principalmente China, India, Sri Lanka y Japón, así como varios países africanos y sudamericanos. Los té verde, blanco, negro y oolong se originan de la misma fuente, es decir, las hojas de la planta de *C. sinensis*. El grado de fermentación es lo que resulta en la clasificación del té, pero el té verde no está fermentado (Tu y Zhu, 2006).

La composición química de las hojas de té incluye: polifenoles⁶, cafeína (aproximadamente el 3.5% del peso seco total), teobromina (0.15–0.2%), teofilina (0.02–0.04%) y otras metilxantinas, lignina (6.5%), ácidos orgánicos (1.5%), clorofila (0.5%), teanina (4%) y aminoácidos libres (1-5 %), y numerosos compuestos ricos en sabor. Además de estos, también están presentes las flavonas, los ácidos y los depósitos fenólicos, los carbohidratos, los alcaloides, los minerales, las vitaminas y las enzimas. El té también contiene flavanoles, principalmente quercetina, kaempferol, miricetina y sus glicósidos. la técnica de procesamiento que no implica fermentación, en el té verde todos estos componentes están bien conservados, especialmente los polifenoles(Gopal et al., 2016). Los efectos más favorables del té

verde están acreditados a los polifenoles. Estos son predominantemente las catequinas, que son equivalentes a 25-35% del peso seco de las hojas del té verde. Los extractos de té verde son ricos en flavanoles y sus derivados del ácido gálico, -catequina, epicatequina (EC), -galocatequina (GC), -epicatequina galato (ECG), -epigalocatequina (EGC), y (-) -epigalocatequina galato (EGCG). Además, contienen una gama de componentes naturales ricos en sabor, como terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos y ácidos orgánicos. De las catequinas, epigalocatequina-3-galato y epicatequina-3-galato son los antioxidantes más eficaces. Otros componentes activos en el extracto incluyen las otras catequinas como la epicatequina y la epigalocatequina. Entre estos, la epigalocatequina-3-galato es la más bioactiva y la más estudiada. EGCG, que es la catequina más abundante en el té verde, representa el 65% del contenido total de catequina. Una taza de té verde puede contener 100–200mg de EGCG. La catequina y la galocatequina están presentes en pequeñas cantidades (Gopal et al., 2016).

El té verde y sus catequinas constitutivas se establecen por sus propiedades antioxidantes, que abarcan aplicaciones en diversas enfermedades asociadas con especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto incluye cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Se ha demostrado que las catequinas son antioxidantes más efectivos que las vitaminas C y E, y su orden de efectividad como eliminadores de radicales es del orden de ECG > EGCG > EGC > EC > catequina (Gopal et al., 2016).

Las propiedades quelantes del metal de las catequinas del té verde también contribuyen de manera importante a su actividad antioxidante. Varios estudios epidemiológicos, así como estudios en modelos animales, han confirmado las propiedades de defensa de que el verde puede ofrecer, contra diversos cánceres como los de la piel, mama, próstata y pulmón. Además de sus propiedades quimiopreventivas para el cáncer, se ha demostrado que el té verde y el EGCG son antiangiogénicos y antimutágenos (Johnson et al., 2011).

El aumento del interés científico y de los consumidores en los beneficios para la salud del té verde y de otros productos herbales como lo es el arándano y sus componentes moleculares, ha llevado a la inclusión de extractos en suplementos nutricionales orales y preparaciones tópicas (Higdon et al., 2017). Los componentes biológicamente activos de estas plantas han demostrado potentes propiedades inhibitoras de enzimas (sin ser bactericidas), una cualidad clave que es importante en el desarrollo de terapias que no harán que los microorganismos desarrollen resistencia (Duarte et al., 2011).

El arándano (*Vaccinium macrocarpon*) ha recibido una atención creciente de los investigadores por su efecto terapéutico en las infecciones del tracto urinario, principalmente al actuar como agente antiadherente, lo cual también ha sido comprobado en streptococcus mutans. Recientemente, la atención se está centrando en el extracto de arándano como posible agente terapéutico en varias otras áreas de la salud, incluidas enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades vasculares (Neto, 2007).

El arándano es la única fruta que ha demostrado de manera consistente y efectiva que inhibe la formación de biopelículas. La prueba colormétrica Folin-Ciocalteu ha demostrado que el arándano tiene uno de los contenidos fenólicos más altos de varias especies de frutas (Un et al., 2002). Las clases fenólicas identificadas en el arándano incluyen ácidos fenólicos, antocianinas y flavonoles y flavan-3-ols, que consisten tanto en monómeros como en las clases de polímeros de procianidinas y proantocianidinas (Cunningham et al., 2001). De las frutas, el arándano es uno de los más altos en la concentración de quercetina, con un rango de 11 a 25mg/100gr de fruta fresca. La quercetina exhibe actividad captadora de radical 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y demuestra una serie de procesos asociados con la inflamación, incluido el óxido nítrico inducido por lipopolisacárido y la producción de citocinas (Ha, 1999).

El té verde y la fruta de arándano americano han recibido especial atención debido a sus componentes únicas de polifenoles y su prevalencia en la dieta humana (Taylor et al., 2009). Una gran cantidad de estudios han informado de actividades bacteriostáticas y bactericidas para compuestos derivados de cientos de plantas similares, pero esta investigación se centró principalmente en realizar el experimento con extracto de arándano y extracto de té verde, debido a su alta tasa de consumo, la relativa falta de toxicidad y la tendencia a ser bacteriostático en lugar de bactericida.

Los efectos del té verde y el arándano en las bacterias que colonizan la cavidad oral pueden ser particularmente significativos, ya que la cavidad oral está expuesta directamente cada vez que se consumen estos productos en la dieta.

El presente estudio evaluó el halo de inhibición de *Streptococcus mutans* in vitro, aplicando discos sensibles impregnados con extracto de té verde al 0.5%, extracto de arándano al 25% y con digluconato de clorhexidina al 0.12% (como grupo control positivo). Este es el primer estudio reportado que comparó, de manera *in vitro*, la actividad inhibitoria del té verde y el arándano frente a *Streptococcus mutans*.

Pregunta de investigación

¿Cuál extracto, el de arándano, o el de té verde forma mayor zona de inhibición en cajas Petri con de agar, inoculadas con *Streptococcus mutans*?

Justificación

Esta investigación se realizó con la finalidad de poder ofrecer a la población opciones seguras, naturales y de fácil acceso en la disminución del riesgo cariogénico, teniendo la seguridad de que han sido probados científicamente.

Es importante recordar que la mayoría de productos hoy en día tienen una base en la herbolaria, incluso en la industria de la odontología la población ha aprobado el uso de enjuagues y pastas dentales realizadas con productos naturales.

Adentrándonos en la odontología preventiva, la odontología mínimamente invasiva y la promoción de la salud, se buscaron alternativas que se puedan encontrar en nuestro país y que son accesibles para su uso y disponibilidad.

La importancia de conocer el efecto antimicrobiano de cada extracto se sugiere pueda no solo ayudar a la población mexicana, también a los investigadores o casas comerciales para adentrarse en lo que la población joven está adoptando como un estilo de vida.

II. ANTECEDENTES

Otake et al (1991) demostró que “Sunfenon”, un extracto crudo de té verde, podría causar una inhibición significativa en la adherencia de *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita recubierta de saliva, así como inhibir la actividad de GTF in vitro. Mostró que cuando las ratas se alimentaban con una dieta enriquecida con “Sunfenon” (tanto en alimentos, como en agua), la formación de caries se inhibía en gran medida. Otake atribuyó los resultados del estudio a la capacidad de “Sunfenon” para prevenir la adherencia e inhibir la enzima GTF, pero también mencionó que “Sunfenon” (o cualquiera de sus componentes) puede ser bactericida. Los autores no ofrecieron posibles mecanismos en cuanto a cómo es bactericida, ni corroboraron tales afirmaciones con ensayos de viabilidad bacteriana.

Nakahara y Tanaka (1993) investigó los efectos inhibitorios de los polifenoles encontrados en el té oolong semifermentado. Los análisis químicos preliminares de las sustancias polifenólicas en el extracto de té oolong mostraron que el extracto de té oolong contenía cantidades significativas de polifenoles desconocidos. Una fracción del extracto de té oolong, designado OTG10, no tenía ningún compuesto de bajo peso molecular y mostró la inhibición más fuerte de la actividad de la glucosil transferasa de *Streptococcus sobrinus*. Los autores no identificaron la estructura exacta de los polifenoles poliméricos en el té oolong, pero sugirieron que la polimerización de catequinas monoméricas durante el proceso de fermentación puede ser crítica para los efectos inhibitorios de la glucosil transferasa.

Yamanaka et al (2004) investigaron las células de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* con jugo de arándano y descubrieron que reducía la hidrofobicidad de la membrana celular, interfiriendo con la adhesión y las etapas iniciales de la formación de biopelícula. Los autores plantearon la Hipótesis de que los componentes del jugo de arándano pueden interactuar con proteínas hidrofóbicas en la membrana celular bacteriana; dado que la hidrofobicidad es un

factor importante en la unión inicial de las bacterias a una superficie, la reducción de la hidrofobicidad disminuye la probabilidad de adhesión.

Steingerg et al (2004) utilizó un componente no dializable de alto peso molecular de jugo de arándano para estudiar sus efectos sobre la actividad de los principales genes de virulencia del *Streptococcus mutans* (gtfB, gtfC y gtfD) y descubrieron que se redujo significativamente las actividades de estos genes y de fructosil transferasa, tanto en solución como adherido a la hidroxiapatita recubierta de saliva.

Duarte et al (2006) realizó un estudio que comparó la eficacia de tres componentes polifenólicos principales del arándano: flavonoles, antocianinas y proantocianidinas. Los resultados mostraron que, de todos los compuestos probados, las proantocianidinas inhibían de manera más eficiente los GTF bacterianos. Más importante aún, demostró que los flavonoles y las proantocianidinas interfieren con la actividad de la ATPasa F de la bacteria, evitando la caída del pH y la posterior acidificación del ambiente extracelular. Los flavonoles como la quercetina son inhibidores no competitivos conocidos de las ATPasas F, pero este fue el primer estudio que demostró capacidades similares en proantocianidina. Los polifenoles del arándano pudieron suprimir múltiples rasgos de virulencia sin afectar la viabilidad bacteriana.

Ribeiro et al (2007). estudiaron diferentes formulaciones de clorhexidina en la reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral, mostraron que se puede lograr una reducción significativa a través del tratamiento intensivo (3-4 aplicaciones diarias durante 2 días) o mediante la aplicación diaria durante 10 y 14 días con gel al 1%(Gazaniga *et al.*, 2007). Sin embargo, dada la gran variación individual en respuesta al tratamiento, los niveles de *Streptococcus mutans* deben ser reevaluados durante el curso del tratamiento. De hecho, el principal problema clínico con el uso de clorhexidina es la dificultad para suprimir o eliminar los *Streptococcus mutans* durante un periodo prolongado de tiempo.

Gregoire et al (2007) examinó específicamente los efectos de los polifenoles de bajo peso molecular encontrados en el arándano. Los flavonoides y sus glucósidos exhibieron efectos significativos pero moderados. Planteó también que el enlace interflavan tipo A es exclusivo de los polifenoles que se encuentran en el arándano, lo que posiblemente explica la falta de actividad inhibitoria de polifenoles similares en frutas como la manzana.

Un estudio realizado por Awadalla et al (2009) para evaluar las posibles propiedades protectoras del té verde en la salud oral, utilizando las medidas: recuento de *Streptococcus mutans* en saliva y placa, valores de pH de la saliva y la placa e índice de sangrado gingival. Los resultados de este estudio mostraron que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los sujetos antes y después del enjuague con té verde al 2% durante 5 minutos, con respecto al recuento de *Streptococcus mutans* en los valores de saliva y placa, pH de la saliva y placa y sangrado gingival. Este estudio respalda la efectividad de la aplicación local del té verde como material antibacteriano y anticariogénico, ya que disminuye la acidez de la saliva y la placa (Awadalla and Ragab, 2011).

Neturi et al (2014) comparó in vivo el té verde con la clorhexidina y agua potable, en la placa y descubrió que el té verde y la clorhexidina eran igualmente efectivos contra *Streptococcus mutans*.

En un estudio reciente realizado por Ann Thomas et al (2016) contra *Streptococcus mutans*, *in vivo*, se encontró que el enjuague bucal de té verde al 0.5% de compuesto fenólico es significativamente mejor que el enjuague bucal de clorhexidina al 0.2%, pero el autor sugiere más investigaciones para corroborar su estudio.

Philip N et al (2019) realizó un estudio in vivo para comparar las pastas dentales que contienen fluoruro de sodio, con las que contienen caseína fosfopéptida-fosfato

de calcio amorfo, suplementado con extracto de arándano rico en polifenoles, y demostró que éstos últimos pueden influir en un cambio a nivel del biofilm oral.

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Caries dental

Se puede definir como una enfermedad multifactorial, prevenible y localizada que es consecuencia de la interacción entre el huésped, la dieta y el biofilm de la superficie dental, en la cual juega un papel importante el tiempo y que causan la desmineralización de los tejidos inorgánicos del diente.

En los últimos años, se lograron avances en la identificación de propiedades de virulencia específicas exclusivas del *Streptococcus mutans*. Se sabe que produce glucanos insolubles utilizando GTF y es, a la vez, acidúrico y acidógeno debido a las bombas de translocación de protones F-ATPasa (Marsh, 2006). La adherencia bacteriana a la superficie dental es el factor más importante para que la superficie dental inicie el proceso de desmineralización.

En la literatura se pudo encontrar que el estudio de extractos naturales para usos medicinales, específicamente antibacterianos e inflamatorios se ha hecho desde varios años atrás.

Los componentes activos del té verde y el arándano se han demostrado en estudios anteriores potencialmente inhibidores de enzimas, lo cual se traduce como una cualidad importante para la eliminación de la carga bacteriana, sin ser bactericida, y esto evita las resistencias bacterianas y haciendo estos productos seguros para un uso diario.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

El extracto de té verde forma mayor zona de inhibición en cajas de agar, inoculadas con *Streptococcus mutans*, en comparación con el extracto de arándano.

Hipótesis nula

El extracto de arándano forma mayor zona de inhibición en cajas con agar, inoculadas con *Streptococcus mutans*, en comparación con el té verde.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Determinar cuál extracto, el de arándano o el de té verde, forma mayor zona de inhibición en cajas de agar, inoculadas con *Streptococcus mutans*.

V.2 Objetivos específicos

- Medir el diámetro de la zona de inhibición del *Streptococcus mutans* después de la aplicación de extracto de arándano al 25%.
- Medir el diámetro de la zona de inhibición del *Streptococcus mutans* después de la aplicación de extracto de té verde al 0.5%.
- Medir el diámetro de la zona de inhibición del *Streptococcus mutans* después de la aplicación de digluconato de clorhexidina al 0.12% como control positivo.
- Comparar los diámetros de las zonas de inhibición del *Streptococcus mutans* después de la aplicación de extracto de arándano al 25%, extracto de té verde al 0.5% y digluconato de clorhexidina al 0.12%.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Tipo de investigación

Experimental *in vitro*

VI.2 Población o unidad de análisis

Cajas Petri con agar tripticasa de soya inoculadas con *Streptococcus mutans* y discos impregnados con extracto de té verde y extracto de arándano.

VI.3. Criterios de selección

Cajas Petri sembradas en monocapa con *Streptococcus mutans*

VI.3.2 Variables estudiadas

- **Variables dependientes:**
 - Halo de inhibición formado por los extractos estudiados.

- **Variables independientes:**
 - Sensidisco impregnado con extracto de té verde al 0.5%
 - Sensidisco impregnado como extracto de arándano al 25%
 - Sensidisco impregnado con digluconato de clorhexidina al 0.12%

VI.4 Técnicas

Se incubaron las cajas Petri con cultivos de *Streptococcus mutans* en agar TYS20B sobre las cuales se colocaron los 4 sensidiscos. El primer sensidisco contenía extracto de arándano al 25%, el segundo disco contenía extracto de té verde al 0.5%, el tercer disco estaba impregnado con digluconato de clorhexidina al 0.12% como control positivo y el último contenía agua bidestilada como control negativo.

Transcurrieron 24 horas para fotografiar las cajas Petri y se realizó la medición de los halos de inhibición de forma digital con el programa Imagej. Los resultados fueron recabados en una base de datos en el programa Excel.

VI.5 Procedimientos

1. Preparación de Agar tripticasa de soya (TYS20B)

- I. Se pesaron en una báscula analítica 10gr de Agar TYS20B, 50gr de sucrosa y 2.5gr de extracto de levadura (Fig. 1a) y se colocaron en un matraz Erlen Meyer de 500mg junto con agua bidestilada agitándolo para obtener una mezcla y se reposó por 15 minutos.
- II. La mezcla se calentó a una temperatura constante hasta llegar al punto de ebullición y obtener una mezcla homogénea.
- III. La solución se colocó en una autoclave para su esterilización a 121°C durante 15 minutos (Fig. 1b).
- IV. Se retiró la solución del autoclave para su enfriamiento, colocando 61µL de bacitracina (Fig. 1c).
- V. Bajo un ambiente estéril se realizó el vaciado de la solución en las cajas Petri y se esperó la gelificación (Fig. 1d).

VI. Se almacenaron en refrigeración a 37°C para su inoculación e incubación.

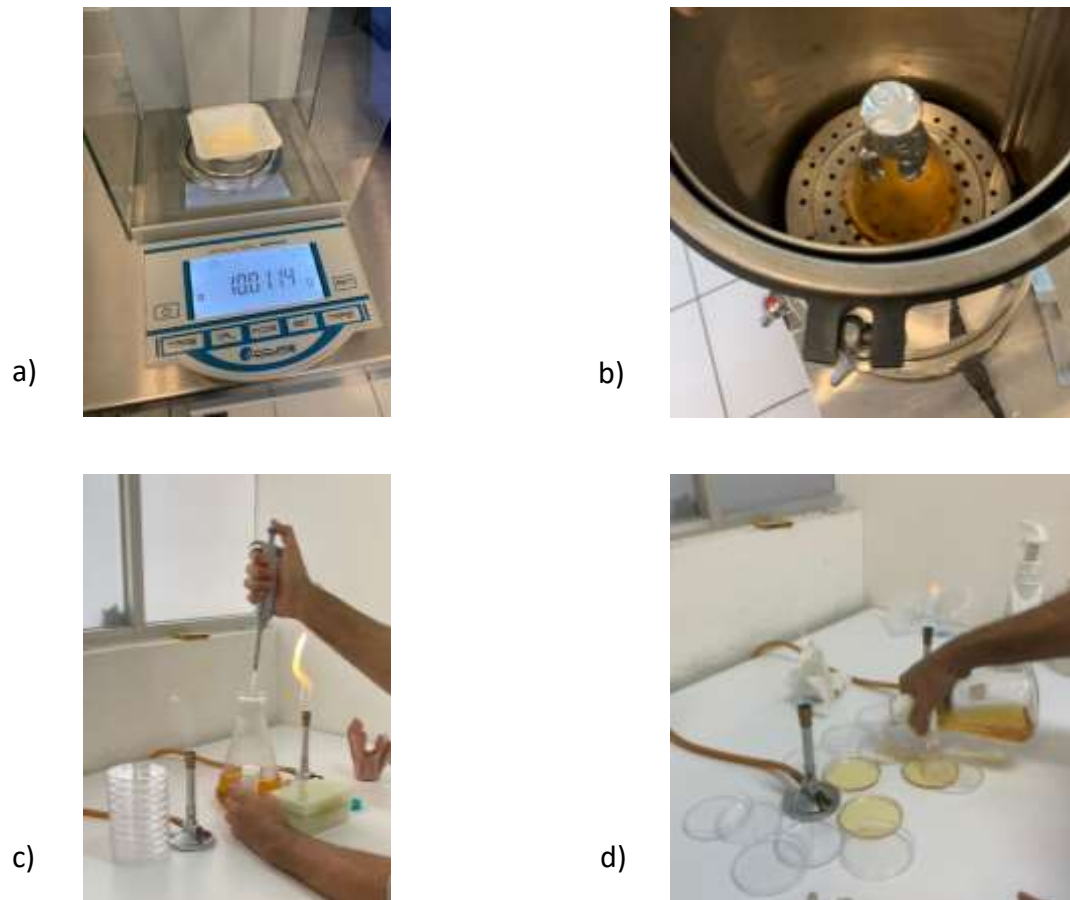


Fig. 1. Preparación del agar tripticasa de soya.

2. Preparación de extractos.

Los extractos fueron preparados por el farmacéutico en el laboratorio de extractos fluidos y secos Rosa Elena Dueñas S.A de C.V.

Extracto de té verde: Se recolectaron 10gr hojas de té verde secas (obtenidas por secado al aire libre) y se trituraron a un tamaño deseable

(2mm aproximadamente) usando un molino eléctrico y posteriormente se percolaron usando solución fisiológica como disolvente. Se dejó reposar por 24 horas. El té verde tiene 6% de compuestos fenólicos, entonces se diluyó el concentrado obtenido para obtener un extracto al 0.5% de éste, utilizando agua bidestilada.

Se etiquetó y almacenó en un frasco color ámbar (Fig. 2a)

Extracto de arándano: Para reducir el periodo post cosecha, los frutos, inmediatamente después de ser recolectados se colocaron en bandejas de polietilentereftalato del tipo clamshells. Se almacenaron a 3°C, hasta ser transportados al laboratorio farmacéutico donde se introdujeron a una cámara de refrigeración a 0°C 12 horas. Se lavaron los frutos con agua potable y se dejaron secar en recipientes. Se trituraron con un molino de mano y se recolectó el líquido-sólido en un tubo de ensayo para centrifugarlo a 4000RPM durante 20 minutos y se obtuvieron dos fases: el sobrenadante y el residuo que se desechó.

El concentrado se dializó con agua bidestilada en bolsas de diálisis con un punto de corte de masa molecular de 12,000 a 4°C por 5 días.

El extracto se preparó incorporando una concentración de 3mg/ml de agua bidestilada.

Se etiquetó y almacenó en un frasco color ámbar (Fig. 2).



Fig. 2. Extractos envasados para el uso en laboratorio.

3. Siembra de cepas

- I. Para continuar con el ambiente estéril, se colocaron dos mecheros de bunsen en la mesa de trabajo.
- II. Se rotularon los especímenes con los códigos CHX para el Sensidisco correspondiente al digluconato de clorhexidina al 0.12%, TV para el sitio del Sensidisco impregnado con té verde al 0.5%, A para el espacio correspondiente al Sensidisco impregnado con arándano al 25% y H2O para el Sensidisco de agua bidestilada (Fig. 3a).
- III. Se tomó la muestra de *Streptococcus mutans* con un hisopo y se colocó en la caja con agar TYS20B, con una distribución uniforme sobre la caja Petri (Fig. 3b).
- IV. En cada espécimen se colocaron 4 sensidiscos estériles de 5mm, cada uno impregnado con cada extracto y control positivo y negativo (Fig. 3c).
- V. Se colocaron los especímenes en la incubadora a 37°C por 24 horas.

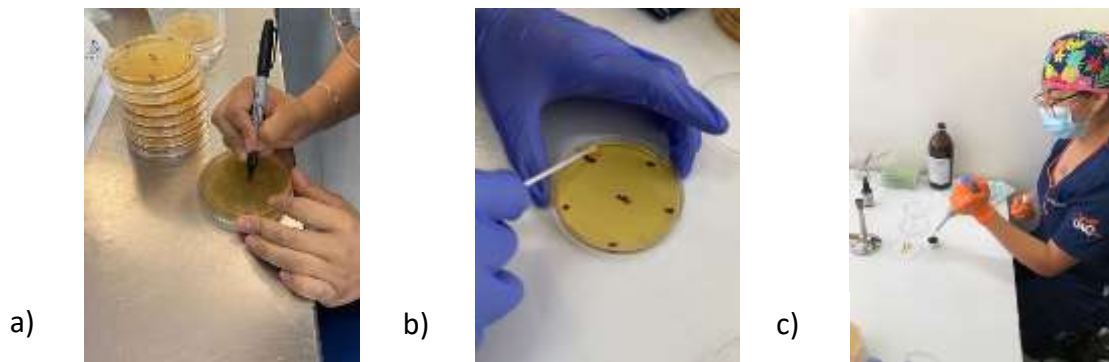


Fig. 3. Siembra de cepas y colocación de sensidiscos impregnados con los extractos y los controles.

4. Medición de halos de inhibición

- I. Transcurridas las 24 horas se tomaron las fotografías para poder ser evaluadas con el programa Imagej (Fig. 4). Los valores obtenidos se

recabaron en una base de datos de Excel para la obtención de resultados.



Fig. 4. Fotografía de espécimen #8.

Una vez realizada esta investigación, los especímenes se esterilizaron en autoclave a 121°C por 30 minutos para eliminar restos orgánicos y su posterior destrucción.

VI.5.1 Análisis estadístico

Se analizaron los datos de la desviación estándar y rango. Con la prueba de Kolmogorov-Smirnov se verificó que las variables seguían una distribución normal. Los datos se sometieron a prueba ANOVA, obteniendo como diferencia estadísticamente significativa $P < .0001$. Posteriormente se realizó la prueba Post Hoc de Tukey.

VI.5.2. Consideraciones éticas

Esta investigación siguió las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, acerca del manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, que fueron:

- 1- La identificación y recolección de los cultivos y cepas de agentes infecciosos se realizó en el momento que se recabaron las fotografías de la investigación (Cajas Petri, hisopos, frascos recolectores, guantes), para ser llevados al área de generación del laboratorio de Análisis Clínico y Bacteriológico de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- 2- Los residuos se esterilizaron en autoclave a 121°C por 30 minutos.
- 3- Los residuos finales se colocaron en bolsas de polietileno color rojo traslúcido calibre 200, siendo que el recolector de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) fuera el personal responsable de hacerlos irreconocibles para su disposición final.

VII. RESULTADOS

El propósito de esta investigación fue demostrar las propiedades antimicrobianas de los extractos estudiados frente a *Streptococcus mutans*, microorganismo que se ha encontrado principalmente en el biofilm dental cariogénico.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron la hipótesis inicial.

En la tabla 1 se muestran las medidas en mm del halo de inhibición del extracto de té verde al 0.5% (TV) y extracto de arándano al 25% (A), así como del digluconato de clorhexidina al 0.12% como control positivo (CONTROL +) y agua bidestilada como control negativo (CONTROL -) ante *Streptococcus mutans*. Además, se muestran los valores promedio de cada uno y la desviación estándar correspondiente a cada halo de inhibición.

Tabla 1. Medias (en mm) de los halos de inhibición del extracto de té verde al 0.5%, extracto de arándano al 25%, digluconato de clorhexidina al 0.12% y agua bidestilada ante Streptococcus mutans.

	TV 0.5% (n=10)	A 0.25% (n=10)	CONTROL + (n=10)	Valor de P
	<i>X ± D.E.</i> <i>(Rango)</i>			
S. <i>mutans</i>	4.132 ± 1.55 (2.08 - 7.52)	3.718 ± 0.906 (2.24 – 5.)	8.620 ± 0.463 (8.15 – 9.45)	< 0.0001 ^{1*}

TV: Té verde; A: Arándano; D.E.: Desviación estándar; ¹: Prueba ANOVA; *: Estadísticamente significativo.

En la tabla 2 se realizó la comparación entre los halos de inhibición formados por los diferentes extractos frente a *Streptococcus mutans*, y se puede apreciar que sí hay una diferencia estadísticamente significativa entre el extracto de té verde al 0.5% y el digluconato de clorhexidina al 0.12%, así como entre el extracto de

arándano al 25% y el digluconato de clorhexidina al 0.12% frente al tipo de bacteria antes mencionada. Por el contrario, no hay diferencia estadísticamente significativa entre el extracto de té verde al 0.5% y el extracto de arándano al 25%.

Entonces, se puede decir que mientras la tabla 1 muestra diferencia entre los milímetros del halo de inhibición del extracto de té verde al 0.5% y el extracto de arándano al 25%, la tabla 2 demuestra que no es estadísticamente significativo.

Tabla 2. Comparación entre el extracto de té verde al 0.5%, extracto de arándano al 25% y digluconato de clorhexidina al 0.12%.

	Estadísticamente significativo
TV 0.5% vs. A 25%	No
TV 0.5% vs. CONTROL +	Yes
A 25% vs. CONTROL +	Yes

TV: Té verde; A: Arándano; Control +: digluconato de clorhexidina al 0.12%

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de los halos de inhibición, se realizó la prueba estadística de comparación múltiple de Tukey Post Hoc.

VIII. DISCUSIÓN

El desarrollo de agentes terapéuticos a base de extractos naturales capaces de inhibir el desarrollo del biofilm dental está siendo de gran interés para los investigadores tanto de casas comerciales como del personal de la salud. El propósito de esta investigación fue determinar la eficacia del extracto de té verde y el extracto de arándano para la inhibición de *Streptococcus mutans* y comparar su eficacia con el estándar de oro que es el digluconato de clorhexidina.

La bioactividad del té verde se ha estudiado desde tiempo remotos en China, pero actualmente han tenido un creciente respaldo científico. Es sabido que el té verde se ha usado para prevenir la caries dental durante décadas. Los mayores efectos del té verde se les han adjudicado a los polifenoles presentes en él, en especial las catequinas (pertenecientes a la familia de los flavonoides) que constituyen alrededor del 30% del peso neto en seco de las hojas, dañando la membrana celular bacteriana, pero también tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

En una investigación realizada en 1991 se demostró que una mezcla de catequinas simples extraídas del té verde en una concentración incluso más baja a lo equivalente a una taza, causó un efecto inhibitorio de la adhesión del *Streptococcus mutans* al esmalte dental.

El arándano, por su parte, se consume en muchos alimentos y bebidas en todo el mundo. La fruta de arándano es una rica fuente de compuestos fenólicos, identificados principalmente cuatro: ácido fenólico, antocianinas, flavonoides y flavan-3-oles, que consisten en monómeros y polímeros de proantocianidinas, siendo estos últimos los asociados a la inhibición de *Streptococcus mutans* (Gupta, Bansal and Marwaha, 2015).

El presente estudio se realizó de manera *in vitro*, por lo cual se evitó el sesgo de los resultados en pacientes, ya que las condiciones de higiene oral, la dieta y el estilo de vida en general de cada individuo pueden dar valores negativos en la investigación.

La hipótesis nula de nuestra investigación se comprobó ya que el extracto de arándano no formó mayor halo de inhibición que el té verde frente a *Streptococcus mutans*.

En nuestro estudio encontramos que el extracto de té verde tiene un mayor efecto antimicrobiano que el extracto de arándano frente a *Streptococcus mutans*, en un estudio in vitro con cajas Petri. Nuestros resultados estuvieron de acuerdo con lo investigado en diversos artículos en los que nos basamos para desarrollar este proyecto, tanto en pruebas con pacientes como en estudios en laboratorio, sin embargo, otras investigaciones hacen referencia a un mayor efecto antimicrobiano del arándano pero usando el jugo que se puede encontrar de manera comercial en el supermercado, aunque en esta investigación decidimos no hacerlo de esa manera, ya que los endulzantes y conservadores podrían involucrarse en el efecto antimicrobiano.

Otras investigaciones hacen referencia al uso de té verde disponible para el consumo en casa, pero de igual manera en esta investigación se optó por llevar a cabo todo el proceso, desde la recolección de las hojas, hasta la concentración del mismo. Las investigaciones antes mencionadas refieren incluso un efecto muy similar al encontrado con el digluconato de clorhexidina, lo que abre una puerta de investigación más de los productos naturales que han tenido cada vez más popularidad en la población, independientemente del estatus socioeconómico.

Aunque los datos obtenidos en este estudio no pudieron identificar qué componentes con exactitud de cada extracto era el que realizaba el efecto antimicrobiano, sí confirmaron que la concentración de ambos extractos (siendo seguros para la aplicación tópica en forma de enjuague bucal) realiza un efecto muy evidente.

Los resultados de esta investigación in vitro sobre el extracto de té verde y extracto de arándano contra *Streptococcus mutans* confirman los estudios donde los refieren como agentes anticariogénicos por su acción antimicrobiana.

IX. CONCLUSIONES

El extracto de té verde al 0.5% presenta un mayor efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* que el extracto de arándano al 25%.

Ninguno de los extractos estudiados en esta investigación superó el efecto antimicrobiano del digluconato de clorhexidina al 0.12%.

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el extracto de té verde al 0.5% y el extracto de arándano al 25%

X. PROPUESTAS

La creciente preocupación de la población por incluir en la vida cotidiana cada vez más productos de origen natural, nos abre puertas al campo de la investigación científica. Productos de fácil acceso y sobre todo que podamos encontrar en nuestro país y que no sea necesario pasar por algún proceso para su consumo podrían ser los próximos a estudiarse, como lo es el aguacate y la flor de Jamaica, pudiendo compararlo con los utilizados en esta investigación.

Tratar de impulsar el plan preventivo antes que el restaurativo en todas las ramas de la odontología debería ser prioritario, pensando en la disminución de la caries dental que es catalogada como de las mayores en México.

3.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anantharaj, A. (2008) 'The effect of povidone-iodine and chlorhexidine mouth rinses on plaque Streptococcus mutans count in 6- to 12-year-old school children : An in vivo study The effect of povidone-iodine and chlorhexidine mouth rinses on plaque Streptococcus mutans count in ', (May 2014).
- Awadalla, H. I. and Ragab, M. H. (2011) 'MO Abbas A pilot study of the role of green tea use on oral health', pp. 110–116. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00440.x.
- Cunningham, D. G. *et al.* (2001) 'Analysis and Standardization of Cranberry Products', pp. 151–166.
- Duarte, S. Y. R. M. M. S. (2011) 'Antimicrobial Traits of Tea- and against Streptococcus mutans', 10010(1003), pp. 327–335. doi: 10.1159/000329181.
- Gazaniga, L. *et al.* (2007) 'The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity : A systematic review of the literature', 35, pp. 359–370. doi: 10.1016/j.jdent.2007.01.007.
- Gopal, J. *et al.* (2016) 'Bactericidal activity of green tea extracts : the importance of catechin containing nano particles', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, pp. 1–14. doi: 10.1038/srep19710.
- Gregoire, S. *et al.* (2007) 'Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and Streptococcus mutans acidogenicity', 103, pp. 1960–1968. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03441.x.
- Gupta, A., Bansal, K. and Marwaha, M. (2015) 'Effect of high-molecular-weight component of Cranberry on plaque and salivary Streptococcus mutans counts in children : An in vivo study', 33(2), pp. 128–133. doi: 10.4103/0970-4388.155125.
- Ha, S. H. (1999) 'Content of the Flavonols Quercetin , Myricetin , and Kaempferol in 25 Edible Berries', pp. 2274–2279. doi: 10.1021/jf9811065.
- Higdon, J. V *et al.* (2017) 'Tea Catechins and Polyphenols : Health Effects , Metabolism , and Antioxidant Functions Tea Catechins and Polyphenols : Health Effects , Metabolism , and Antioxidant Functions', 8398(August). doi: 10.1080/10408690390826464.

- Lakade, L. S., Shah, P. and Shirol, D. (2014) 'Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the Mutans streptococcus count in plaque', 32(2). doi: 10.4103/0970-4388.130780.
- Loesche, W. (2007) 'Dental Caries and Periodontitis : Contrasting Two Infections That Have Medical Implications', 21, pp. 471–502. doi: 10.1016/j.idc.2007.03.006.
- Malhotra, N. (2011) 'Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against Streptococcus mutans, Lactobacilli and Candida albicans', (January).
- Manuscript, A. (2011) 'NIH Public Access', 17(1), pp. 3–13. doi: 10.1016/j.phymed.2009.09.011.Green.
- Marsh, P. D. (2006) 'implications for health and disease', 7, pp. 1–7. doi: 10.1186/1472-6831-6-S1-S14.
- Marsh, P. D. (2019) 'SGM Special Lecture Are dental diseases examples of ecological catastrophes ?', (2003), pp. 279–294. doi: 10.1099/mic.0.26082-0.
- McKay, D. L. *et al.* (2017) 'The Role of Tea in Human Health : An Update The Role of Tea in Human Health: An Update', 5724(August). doi: 10.1080/07315724.2002.10719187.
- Neto, C. C. (2007) 'Review Cranberry and blueberry : Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases', pp. 652–664. doi: 10.1002/mnfr.200600279.
- Rao, A. (2014) 'Comparative evaluation of chlorhexidine and sodium fluoride mouthwashes on streptococcus mutans Original Article Comparative evaluation of chlorhexidine and sodium fluoride mouthwashes on streptococcus mutans', (May), pp. 16–21.
- Tapiero, H. *et al.* (2002) 'Polyphenols : do they play a role in the prevention of human pathologies ?', pp. 200–207.
- Taylor, P. W., Hamilton-miller, J. M. T. and Stapleton, P. D. (2009) 'Europe PMC Funders Group Antimicrobial properties of green tea catechins', pp. 71–81.
- Thomas, A., Thakur, S. and Mhambrey, S. (2015) 'Comparison of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine , sodium fluoride , fluoride with essential oils , alum , green tea , and garlic with lime mouth rinses on cariogenic microbes'.

doi: 10.4103/2231-0762.161759.

- Tu, Y. and Zhu, Y. (2006) 'Original article A review of recent studies in China on the possible beneficial health effects of tea', pp. 333–340. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.01076.x.
- Un, J. I. E. S. *et al.* (2002) 'Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits', (1).
- Vale, G. C. *et al.* (2014) 'Recolonization of Mutans Streptococci after Application of Chlorhexidine Gel', 25, pp. 485–488.
- Zafar, S., Harnekar, S. Y. and Siddiqi, A. (no date) 'Early childhood caries : etiology , clinical considerations , consequences and management'.

XI. ANEXOS

1. Tabla de datos en Excel

ESPECIMEN	TV 0.5%	A 0.25%	CONTROL +	CONTROL -
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
PROMEDIO				
DESVIACIÓN ESTÁNDAR				
RANGO				

2. Instrumental e insumos utilizados

1. Placas Petri (Senna®, 60 x 15, producto previamente estéril)
2. Agar Soya Trypticaseína (IBI ®, Fco 500 gr)
3. Mechero de bunsen
4. Matraz de Erlenmeyer
5. Espátula de Digralsky (Asa de siembra de vidrio)
6. Extracto de té verde al 0.5% (elaborado por farmacéutico)
7. Extracto de arándano al 25% (elaborado por farmacéutico)
8. Digluconato de clorhexidina al 0.12% (Consepsis ®)
9. Agua bidestilada (PiSa ®)
10. Sensidiscos
11. Loseta de vidrio
12. Termómetro
13. Guantes

14. Cuchara dosificadora
15. Cubre bocas.
16. Campos estériles
17. Bata desechable
18. Lentes de protección
19. Plumín indeleble
20. Cinta adhesiva (maskin-tape)
21. Cronometro