

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL  
AGARICUS BISPORUS SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS Y  
LACTOBACILLUS. UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO, CONCEPCIÓN,  
2018.**

**POR: EDISON PARRA, CAMILA RIFFO.**

**Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo  
para optar al grado académico de licenciado en odontología.**

**PROFESORES GUÍA.**

**BIOQUÍMICO, LICENCIADO EN BIOQUÍMICA, DIPLOMADO EN  
PEDAGOGÍA UNIVERSITARIA, MAGÍSTER EN EDUCACIÓN SUPERIOR  
MENCIÓN PEDAGOGÍA UNIVERSITARIA. CARMEN GLORIA NARVÁEZ C.  
ENFERMERA, MAGÍSTER EN EPIDEMIOLOGÍA, DOCENTE DE  
INVESTIGACIÓN. CONSTANZA NEIRA U.**

**Diciembre 2018  
CONCEPCIÓN**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a nuestros profesores guías y laboratoristas, por su colaboración y buena voluntad durante todas las etapas de este trabajo, entregándonos las herramientas necesarias para poder llevar a cabo la investigación. También agradecemos a nuestros padres por darnos el apoyo y la gran oportunidad de aprender y ampliar nuestros horizontes.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	2
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	3
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	4
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	5
<b>RESUMEN</b>	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	10
<b>MARCO TEÓRICO</b>	12
<b>HIPÓTESIS</b>	19
<b>OBJETIVOS</b>	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
<b>RESULTADOS</b>	29
<b>DISCUSIÓN</b>	46
<b>CONCLUSIONES</b>	49
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Variables.	28
TABLA 2. Halo de inhibición (milímetros) en relación al macerado de <i>Agaricus bisporus</i> y controles sobre <i>Lactobacillus</i> .	34
TABLA 3. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones del <i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar y controles sobre <i>Lactobacillus</i> .	35
TABLA 4. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones de <i>Agaricus bisporus</i> filtrado y controles sobre <i>Lactobacillus</i> .	35
TABLA 5. Halo de inhibición (milímetros) en relación al macerado de <i>Agaricus bisporus</i> y controles sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	36
TABLA 6. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones del <i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar y controles sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	38
TABLA 7. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones de <i>Agaricus bisporus</i> filtrado y controles sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Aplicación del macerado sin diluir de <i>Agaricus bisporus</i> en una placa Petri con <i>Agar Mitis Salibarius</i> sembrado con <i>Streptococcus mutans</i> .	21
FIGURA 2. Al lado izquierdo se observa la dilución con agua destilada en base a un macerado de <i>Agaricus bisporus</i> filtrado y al lado derecho sin filtrar.	21
FIGURA 3. Plaqueo de <i>Agar Mitis Salivarius</i> en campana de laboratorio.	23
FIGURA 4. Tubo de ensayo con suero y la bacteria, taponado con algodón hidrófobo agitándose en el <i>Vortex</i> .	24
FIGURA 5. Sembrado de <i>Streptococcus mutans</i> con hisopo estéril en placa Petri con <i>Agar Mitis Salivarius</i> .	24
FIGURA 6. Maceración del <i>Agaricus bisporus</i> con mortero estéril en campana del laboratorio.	25
FIGURA 7. Filtrado del macerado <i>Agaricus bisporus</i> en matraz de <i>Kitasato</i> con papel filtro.	25
FIGURA 8. Aplicación de diluciones de <i>Agaricus bisporus</i> con micro pipeta.	26
FIGURA 9. Estufa con jarras de anaerobiosis que en su interior están las placas Petri.	27
FIGURA 10. Placas Petri que contienen <i>Agar Rogosa</i> sembradas con <i>Lactobacillus</i> a las que fue aplicada el agua destilada estéril como control negativo, no se observó halo de inhibición.	29
FIGURA 11. Placas Petri que contienen <i>Agar Rogosa</i> sembradas con <i>Lactobacillus</i> a las que fue aplicado el macerado de <i>Agaricus bisporus</i> , no se observó halo de inhibición.	29
FIGURA 12. Placas Petri que contienen <i>Agar Rogosa</i> sembradas con <i>Lactobacillus</i> a las que fue aplicada la dilución de <i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar al 25%, no se observó halo de inhibición.	30
FIGURA 13. Placas Petri que contienen <i>Agar Rogosa</i> sembradas con <i>Lactobacillus</i> a las que fue aplicada la dilución de <i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar al 50%, no se observó halo de inhibición.	30

- FIGURA 14. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 75%, no se observó halo de inhibición. 31
- FIGURA 15. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 100%, no se observó halo de inhibición. 31
- FIGURA 16. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus filtrado* al 25%, no se observó halo de inhibición. 32
- FIGURA 17. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus filtrado* al 50%, no se observó halo de inhibición. 32
- FIGURA 18. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus filtrado* al 75%, no se observó halo de inhibición. 33
- FIGURA 19. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución del macerado de *Agaricus bisporus filtrado* al 100%, no se observó halo de inhibición. 33
- FIGURA 20. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la clorhexidina al 0,12% como control positivo, se observó halo de inhibición, con una media de 2,9 milímetros. 34
- FIGURA 21. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada el agua destilada estéril como control negativo, no se observó halo de inhibición. 35
- FIGURA 22. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicado el macerado de *Agaricus bisporus*. 36
- FIGURA 23. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la clorhexidina al 0,12% como control positivo, se observó halo de inhibición. 37

- FIGURA 24. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 25%. Se observan halos de inhibición. 38
- FIGURA 25. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 50%. Se observan halos de inhibición. 38
- FIGURA 26. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 75%. Se observan halos de inhibición. 39
- FIGURA 27. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 100%. Se observan halos de inhibición. 39
- FIGURA 28. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 25%. Se observan halos de inhibición. 41
- FIGURA 29. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 50%. Se observan halos de inhibición. 41
- FIGURA 30. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 75%. Se observan halos de inhibición. 42
- FIGURA 31. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 100%. Se observan halos de inhibición. 42
- FIGURA 32. Placas Petri con *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans*, al lado izquierdo se encuentra la dilución de *Agaricus bisporus* macerado sin filtrar al 100% y en la derecha la dilución de *Agaricus bisporus* macerado filtrado al 100%. 43

FIGURA 33. Se llevó la muestra adquirida de los halos inhibitorios con un asa de siembra y se ubicó en porta objetos para cada una de las muestras. 43

FIGURA 34. Placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Agaricus bisporus* sin lavar con agua destilada estéril. Se observa el crecimiento de variados microorganismos. 44

FIGURA 35. Placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Agaricus bisporus* lavado con agua destilada estéril. No se observa crecimiento de microorganismos. 45

FIGURA 36. Placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Streptococcus mutans* a la que se le aplicó en la perforación la dilución del macerado de *Agaricus bisporus* filtrado y lavado con agua destilada estéril. Se observa decoloración que no afecta al crecimiento del *Streptococcus mutans*. 45

## RESUMEN

**Introducción:** Los hongos comestibles son conocidos por sus propiedades farmacológicas y culinarias, es un alimento de alta calidad, rico en proteínas, vitaminas y minerales y debido a su riqueza de compuestos como terpenos, sesquiterpenos, esteroides, antraquinonas y derivados del ácido benzoico, es una fuente de antibióticos naturales. **Objetivo:** Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Agaricus bisporus* en *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*. **Material y Método:** Se realizó un estudio cuantitativo, experimental, *in vitro*. Se utilizó como muestra mínima 3 réplicas para el grupo control positivo (clorhexidina 0,12%), 3 para el control negativo (agua destilada), 3 para el macerado sin diluir y 3 para cada dilución en base a un macerado de *Agaricus bisporus* filtrado (25%, 50%, 75% y 100%) y sin filtrar (25%, 50%, 75% y 100%). 33 placas para cada cepa de bacteria. Las placas fueron asignadas al azar y posterior a cada siembra se realizó una perforación con sacabocado, donde se aplicaron los distintos tratamientos. Luego de 5 días en jarra de anaerobiosis se midieron los diámetros de los halos. Una vez que se obtuvieron todos los datos se llevaron a la planilla *Excel* y se utilizaron medidas de mínimo, máximo y desviación estándar. **Resultados:** Al analizar las placas Petri sembradas con *Lactobacillus*, no se observó halo de inhibición con excepción del control positivo realizado con clorhexidina 0,12%, al contrario, los tratamientos utilizados en las placas con *Streptococcus mutans*, que sí presentaron diferentes halos inhibitorios, destacando la dilución sin filtrar del macerado al 100%, con un halo de 7,5 milímetros como máxima y una media de  $5,5 \pm 2,2$  milímetros y además, su efecto se mantuvo en las concentraciones mínimas inhibitorias de *Agaricus bisporus* filtrado y sin filtrar al 25%. **Conclusión:** El *Agaricus bisporus* no demostró efectividad antibacteriana frente a cultivos de *Lactobacillus*, sin embargo, frente a cultivos de *Streptococcus mutans* sí demostró efectividad antibacteriana en todas las concentraciones utilizadas, los halos de inhibición fueron de tipo bacteriostático, donde se pudo observar el crecimiento de otro tipo comunidad microbiana la cual está asociada al hongo y al mismo tiempo, una disminución en el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad muy prevalente y que afecta a la gran parte de la población, siendo considerada un problema para la salud bucal. (Fernández, 2016; Echeverría, Herrera, Henríquez, Sepúlveda & Maldonado, 2012; Palomer, 2006 )

Esta enfermedad es un proceso patológico multifactorial (Núñez & García, 2010) que afecta a las estructuras dentarias y en cada etapa de progresión de esta lesión, predominan distintas especies microbianas, siendo el *Streptococcus Mutans* el tipo bacteriano principal que coloniza la superficie dental causando el inicio de la lesión (Figueroa, Alonso & Acevedo, 2008) y el *Lactobacillus* una de las principales bacterias oportunistas que predomina en las etapas más avanzadas de la lesión. (Figueroa, Alonso & Acevedo, 2008).

Estas bacterias por medio de sus factores de virulencia, metabolismo de carbohidratos, habilidades acidogénicas y acidúricas, forman un desequilibrio iónico en el proceso de mineralización y desmineralización de los tejidos duros del diente, provocando la pérdida de minerales del tejido dentario y la posterior formación de una cavidad. (Castro, 2005)

Numerosos estudios se han destinado a investigar sobre la prevención, en busca de medidas naturales que controlen la formación de placa bacteriana dental y así reducir la presencia del agente patógeno. Es así como, paralelo a la industria farmacéutica, existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar sustancias naturales que posean propiedades farmacológicas antibacterianas. (Castro, 2005).

Los hongos silvestres y cultivados contienen una gran diversidad de biomoléculas con propiedades nutricionales y / o medicinales. Debido a estas propiedades, son reconocidos como alimentos funcionales y como una fuente para el desarrollo de medicamentos y nutraceuticos (Alves, Ferreira, Díaz, Teixeira, Martins & Pintado, 2012).

Los cuerpos fructíferos, micelios y esporas acumulan una variedad de metabolitos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras, cardiovasculares, protectoras del hígado, antifibróticos, antiinflamatorios, antivíricos, antioxidantes, antitumorales y antimicrobianos (Alves & cols., 2012).

El uso frecuente de hongos se basa en tres supuestos principales: primero, se usan como parte de una dieta regular por su valor nutricional, ya que son ricos en agua, minerales, proteínas, fibras y carbohidratos, y son alimentos bajos en calorías. En segundo lugar, los cuerpos fructíferos también son apreciados por su delicadeza, son potenciadores de sabor y aroma de palatabilidad cuando se asocian a otros alimentos; y en tercer lugar, los hongos son ampliamente utilizados con fines medicinales. Su acción farmacológica y su interés terapéutico en promover la salud humana se conocen desde hace miles de años. Además destacar que especies del genero *Agaricus* han demostrado actividad antimicrobiana (Alves & cols., 2012).

Es por eso que en el presente estudio evaluaremos el efecto del *Agaricus bisporus*, uno de los hongos más cultivados y utilizados en la cocina, frente al crecimiento bacteriano de las principales cepas que causan la caries dental.

## MARCO TEÓRICO

La caries dental es el problema de salud más extendido entre la población de todas las edades, siendo descrita como como una enfermedad multifactorial relacionada con la dieta, bacterias intraorales, composición de la saliva y otros factores (Hidalgo, Duque de Estrada & Pérez, 2008).

Así la caries dental involucra la interacción en el tiempo de una superficie dental susceptible, las bacterias cariogénicas, y la disponibilidad de una fuente de carbohidratos fermentables, especialmente sacarosa (Hidalgo & cols., 2008).

En esta enfermedad existen muchos determinantes en su inicio y progreso, siendo muy importante para el control de las caries la prevención y preocupación en el ámbito de la higiene bucal, ya que la complejidad de la enfermedad está asociada con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a otra patológica. Una biopelícula sana puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013).

La presencia de las bacterias desencadenantes del proceso carioso es fundamental para la instauración de una caries. Tradicionalmente se ha identificado al *Streptococcus mutans* y al *Lactobacillus* con el inicio y la progresión de la caries radicular. Más concretamente, al *Streptococcus mutans* como el iniciador de la caries radicular y al *Lactobacillus* en caries de raíz en estado avanzado (Gutiérrez, Alós, García & González, 2006).

El *Streptococcus mutans* es el principal tipo bacteriano que coloniza la superficie dental causando el inicio de la lesión y el *Lactobacillus* una de las principales bacterias oportunistas que predomina en las etapas más avanzadas de la lesión. (Figuroa, Alonso & Acevedo, 2008).

En términos microbiológicos el *Streptococcus mutans* es un coco grampositivo, dispuesto en cadenas cortas de 4 a 6 cocos o largas, los cuales miden de 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro, anaerobios facultativos y son parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas, pero también son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa, entre otras (Figuroa & cols., 2008).

Es un productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido (Ojeda & cols., 2013).

Los principales factores de patogenicidad presentes en *Streptococcus mutans* son sus principales características como acidógeno, acidófilo y acidúrico; síntesis de polisacáridos extracelulares; síntesis de polisacáridos intracelulares; su capacidad adhesiva por las proteínas salivales que posibilitan su adhesión a superficies duras; capacidad agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos. Además la habilidad del *Streptococcus mutans* a través de las glucosiltransferasas de sintetizar glucanos insolubles, facilita la formación de la biopelícula dental (Figuroa & cols. 2008).

El *Streptococcus mutans* se ha considerado por muchos años como el principal agente etiológico de la caries dental, este produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa dentro de la cavidad bucal. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización (Ojeda & cols., 2013).

El *Lactobacillus*, es un bacilo grampositivo, anaerobio facultativo, acidógeno y acidúrico, pH cercanos a 5 favorecen su crecimiento, así como el inicio de su actividad proteolítica. Se adhieren muy poco a superficies lisas, por lo que deben utilizar otros mecanismos para colonizar las superficies dentarias. Entre estos mecanismos podemos mencionar la unión física por atrapamiento en superficies retentivas, tales como: fosas y fisuras oclusales o caries cavitada y la coagregación con otras especies bacterianas formando la biopelícula dental (Figueroa & cols., 2008). Por lo tanto, se asocian mayormente con la colonización de zonas retentivas creadas por las lesiones en las que quedan atrapados físicamente, aumentando en número durante la progresión y avance de la caries (Giacaman, Muñoz, Bravo & Farfán, 2013).

La estadística encontrada entre el recuento de *Lactobacillus* y la presencia de cavidades es acorde con varios estudios, que informan una relación entre el recuento alto de este microorganismo y la presencia de lesiones avanzadas. Una posible explicación para esta afirmación es la incapacidad de *Lactobacillus* de adherirse a superficies lisas para lo cual

aprovecha fisuras, fosas o cavitaciones para colonizar. Es considerado acidógeno y acidúrico, en presencia de hidratos de carbono dietarios produce sustancias como etanol, CO<sub>2</sub> y ácido láctico por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa, dando como resultado la acidificación del pH salivar (Martínez, Morales & Martínez, 2013).

El control de esta enfermedad causada por el desequilibrio entre la mineralización y desmineralización en los tejidos dentarios, en general está dado por el cepillado, enjuagues bucales, seda dental y uso de otros elementos de higiene, que garantizan la remoción de placa bacteriana (Rizzo, Torres & Martínez, 2016). Cuando el daño ya está instaurado, y estamos frente a una lesión cariosa, el tratamiento convencional de elección es la remoción mecánica de los tejidos con instrumentos manuales y rotatorios, tratando de que el remanente dentario se preserve sano (Díaz, Jans & Zaror, 2017). Esta alternativa terapéutica deja como secuela una preparación cavitaria que requiere ser restaurada para permitir recobrar su morfología, función y estética; otorgando de esta manera salud y equilibrio al ecosistema bucal (Butorovic, 2012).

La importancia en el control e identificación de los principales agentes etiológicos durante el inicio, desarrollo y progresión de la lesión de caries, puede ser el blanco de nuevos mecanismos terapéuticos, y así evitar a futuro el uso de técnicas invasivas que llevan al sacrificio de tejido dentario (Figuroa, Alonso & Acevedo, 2008).

Es así como, paralelo a la industria farmacéutica, existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar sustancias naturales que posean propiedades farmacológicas

antibacterianas que controlen la formación de placa bacteriana dental y reducir la presencia de agentes patógenos (Castro, 2005).

A pesar de la gran diversidad de compuestos antibacterianos, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha aumentado drásticamente convirtiéndose en un serio problema de salud y un reto para el futuro (Serra, 2017), creando la urgente necesidad de nuevas soluciones, siendo los hongos una fuente alternativa de nuevos antimicrobianos, tomando en consideración que los datos disponibles en la literatura indican actividad antimicrobiana de los extractos de hongos contra bacterias grampositivas (Alves & cols., 2012).

La biología y el cultivo de hongos es un área de la ciencia en expansión, debido a que su consumo es cada vez mayor en la cultura occidental (Zanes & Teixeira, 2007). Hay un gran número de científicos que trabajan en diferentes colegios, universidades y empresas de investigación en proyectos sobre hongos comestibles y medicinales. Esto es un reflejo del cambio que se produjo en los hábitos alimentarios de la sociedad, que se debe al descubrimiento del valor medicinal y culinario de los hongos, así como a la mejora de su calidad de vida en general (Souza, 2010).

El uso frecuente de hongos se basa en tres supuestos principales: primero, se usan como parte de una dieta regular por su valor nutricional, ya que son ricos en ergosterol, minerales (calcio, potasio, fósforo, magnesio, hierro, zinc), vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido ascórbico), enzimas hidrolíticas que ayudan en la digestión, fibras, proteínas y carbohidratos (Llauradó, Morris, Albear, Castán & Bermúdez, 2011).

En segundo lugar, los cuerpos fructíferos también son apreciados por su delicadeza, son potenciadores de sabor y aroma de palatabilidad cuando se asocian a otros alimentos; y en tercer lugar, los hongos son ampliamente utilizados con fines medicinales (Alves & cols., 2012).

Los hongos del género *Agaricus* son conocidos por sus propiedades farmacológicas, culinarias y su composición nutricional como alimentos funcionales. El término alimento funcional atribuido a los hongos comestibles, se debe a su rico valor nutricional y propiedades terapéuticas descritas por varios investigadores, pero para ser clasificados así, deben incluirse en los hábitos alimenticios diarios, proporcionando a los consumidores beneficios fisiológicos específicos, bienestar, calidad de vida, salud y reducir el riesgo de enfermedad. (Vinhaal, Vinhaal & Carvalho, 2012)

Los hongos agaricales pueden usarse como adyuvante en la terapia del cáncer, los mecanismos de acción de las sustancias bioactivas presentes en los hongos todavía no se conocen completamente, pero parece haber evidencia científica clara que sugiere que estas sustancias contribuyen a modular las etapas de iniciación y progresión de la carcinogénesis, lo que propicia beneficios a individuos con varios tipos de cáncer, principalmente por actividad inmunoestimulante (Vinhaal & cols., 2012).

El *Agaricus bisporus* es el hongo comestible más silvestre y más cultivado, representando más del 40% de la producción mundial de hongos. Se cultiva en más de 70 países y en todos los continentes, excepto en la Antártida. Tiene una alta actividad biológica, baja toxicidad y se utiliza en medicinas clásicas populares, saborizantes de

productos alimenticios, perfumería, cosmética y farmacéutica (Mohamed, 2012). Es un alimento con excelente valor nutricional debido a su composición química (Andrade, Jesús, Vieira, Viana, Spoto & Minhoni, 2014) y tiene muchos metabolitos medicinales responsables de la actividad terapéutica para el tratamiento y la prevención de muchas enfermedades humanas, actuando como agente anticanceroso; agente antimicrobiano (agaritina y alcoholes); agente protector de hepatocitos; agente de soporte para la salud humana y metabolitos potenciadores del sistema inmunitario (Mohamed, 2012).

Varias especies del género *Agaricus* han demostrado actividad antimicrobiana (Alves & cols., 2012), a pesar de esto, y de todas las propiedades beneficiosas que pueden llegar a tener estos hongos comestibles para el ser humano, existe un gran vacío de conocimiento en la literatura y falta de estudios científicos sobre el *Agaricus bisporus*.

Estos antecedentes, justifican la necesidad de estudiar el efecto antibacteriano in vitro del *Agaricus bisporus*, frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, los principales microorganismos que participan en la formación de la caries dental.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis de trabajo:**

El *Agaricus bisporus* tiene efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.

### **Hipótesis nula:**

El *Agaricus bisporus* no posee efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto antibacteriano in vitro del *Agaricus bisporus* en *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el efecto antibacteriano del *Agaricus bisporus* en el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Determinar el efecto antibacteriano del *Agaricus bisporus* en el crecimiento de *Lactobacillus*.

Determinar la concentración mínima inhibitoria del *Agaricus bisporus* en el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Determinar la concentración mínima inhibitoria del *Agaricus bisporus* en el crecimiento de *Lactobacillus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio cuantitativo, experimental, *in vitro*, con el fin de estudiar el efecto del *Agaricus bisporus*, frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.

En cuanto a los criterios de selección se utilizaron hongos frescos, de origen comercial con garantía de inocuidad y dentro de su fecha establecida de vencimiento.

La muestra mínima necesaria fue de 3 réplicas por cada grupo en sus distintas concentraciones. Se usaron 3 réplicas para el grupo control positivo que fue clorhexidina 0,12%, 3 para el control negativo que fue agua destilada, 3 para el macerado sin diluir de *Agaricus bisporus* (figura 1) y 3 para cada dilución con agua destilada estéril en base a un macerado de *Agaricus bisporus* filtrado (25%, 50%, 75% y 100%) y 3 sin filtrar (25%, 50%, 75% y 100%) (figura 2).

FIGURA 1. Aplicación del macerado sin diluir de *Agaricus bisporus* en una placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrado con *Streptococcus mutans*.



FIGURA 2. Al lado izquierdo se observa la dilución con agua destilada en base a un macerado de *Agaricus bisporus* filtrado y al lado derecho sin filtrar.



Las unidades de análisis fueron 33 placas para cada cepa de bacteria. 66 placas en total, incluyendo los tratamientos positivos y negativos. Las placas fueron asignadas al azar y se incluyó 1 perforación con sacabocado a cada placa donde se aplicaron los distintos tratamientos.

Se cultivó la cepa *Streptococcus mutans* sobre 2 placas Petri con *Agar Mitis Salivarius*, las cuales fueron a la estufa de incubación (Q-317m-22) por 72 horas a 37° C. Pasado los 3 días se vio flora bacteriana homogénea, se pasaron las bacterias al refrigerador a 4°C hasta que fueron utilizadas y se realizó el mismo procedimiento con *Lactobacillus* en *Agar Rogosa*. Simultáneamente se prepararon en el laboratorio 33 placas Petri con *Agar Mitis Salivarius*, para su preparación en un vaso precipitado se pesaron 21,6 gramos de *Agar Mitis Salivarius* y 5,4 gramos de sacarosa en la pesa electrónica, luego se midieron 300 mililitros de agua destilada estéril en una probeta de 500 mililitros y se mezcló todo en un Matraz *Erlenmeyer* de 500 mililitros, la mezcla se agitó con una bagueta y se procuró que no quedara agar en las paredes del matraz; luego se le realizó un tapón de algodón hidrófobo y se puso un papel Kraft sujeto con una cinta indicadora de esterilización y se llevó al autoclave (Q-317m-22), este proceso duró 20 minutos, una vez frío el agar, en la campana de laboratorio se llenaron las 33 placas Petri hasta la

mitad aproximadamente (figura 3), se dejó gelificar, se les puso parafilm para sellarla y posterior a esto se dejaron en el refrigerador a 4°C hasta el día que se utilizaron.

FIGURA 3. Plaqueo de *Agar Mitis Salivarius* en campana de laboratorio.



La preparación del *Agar Rogosa* se llevó a cabo mezclando 29,76 gramos de *Agar Rogosa* con 528 micro litros de ácido acético y en la campana se expuso al mechero hasta que hirviera, se esperó a que enfriara y se realizó el plaqueo en la campana de laboratorio.

Luego se tomaron las placas Petri cultivadas con *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* que se encontraban refrigeradas, se llevaron a la campana del laboratorio y se realizó un cultivo con el método de comparación *Mc. Farland* para cada cepa, donde en un tubo de ensayo de 15 mililitros con suero fisiológico, se tomaron colonias del cultivo de una placa Petri con un asa de siembra previamente flameada en el mechero y se agregaron al tubo de ensayo, utilizando un tapón de algodón hidrófobo se llevaron al *Vortex* haciendo que las colonias bacterianas se diluyan (figura 4), hasta que se logró una turbidez equivalente la solución *Mc. Farland* ( $1,5 \times 10^8$  células) para cada bacteria.

FIGURA 4. Tubo de ensayo con suero y la bacteria, taponado con algodón hidrófobo agitándose en el *Vortex*.



A continuación con un hisopo estéril se distribuyó el inóculo de los tubos de ensayo aplicándolo por toda la extensión de las placas Petri con los medios de cultivo respectivos de cada bacteria en forma de barrido (figura 5), posterior a cada siembra el hisopo fue eliminado.

FIGURA 5. Sembrado de *Streptococcus mutans* con hisopo estéril en placa Petri con *Agar Mitis Salivarius*.



Luego se procedió a realizar las perforaciones a cada placa para luego llenarlas con los controles positivo, controles negativo, macerado de *Agaricus bisporus* sin diluir, macerado de *Agaricus bisporus* diluido y filtrado al 25%, 50%, 75%, 100% y macerado de *Agaricus bisporus* diluido sin filtrar al 25%, 50%, 75%, 100%. Para la versión sin diluir, se maceró 100 gramos de *Agaricus bisporus* con el mortero estéril (figura 6) y se aplicó directamente en las perforaciones.

FIGURA 6. Maceración del *Agaricus bisporus* con mortero estéril en campana del laboratorio.



Para las diluciones se mezclaron 100 gramos de *Agaricus bisporus* con 100 mililitros de agua destilada estéril para luego ser diluidas en las distintas concentraciones directamente en el caso de la versión sin filtrar, mientras que la versión filtrada antes de diluirla, se filtró ocupando el matraz de *Kitasato* con papel filtro (figura 7).

FIGURA 7. Filtrado del macerado *Agaricus bisporus* en matraz de *Kitasato* con papel filtro.



La cantidad utilizada para llenar cada perforación fue de 150 micro litros para las diluciones (figura 8) y una porción de *Agaricus bisporus* al azar para el macerado sin diluir.

FIGURA 8. Aplicación de diluciones de *Agaricus bisporus* con micro pipeta.



Luego las placas Petri se introdujeron en la jarra de anaerobiosis, se utilizó vela para las jarras de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, para así generar un ambiente de anaerobiosis dentro de la jarra, luego estas fueron llevadas a la estufa por 5 días a 37°C (figura 9).

FIGURA 9. Estufa con jarras de anaerobiosis que en su interior están las placas Petri sembradas con las bacterias que contienen los distintos tratamientos aplicados.



Pasado los 5 días se retiró de la jarra de anaerobiosis, se midieron los diámetros de los halos y una vez que se obtuvieron todos los datos se llevan a la planilla *Excel*, se utilizaron medidas de mínimo, máximo y desviación estándar para realizar el análisis descriptivo. En cuanto a las consideraciones éticas, se siguieron todas las normas del laboratorio y protocolos de trabajo establecidos por la Universidad.

TABLA 1. Variables.

Variable	Clasificación variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador
Halos de inhibición	Cuantitativa, Continua, Razón. Dependiente.	Aureola que se forma alrededor de las perforaciones producto de la muerte bacteriana.	Milímetros de aureola formada por la muerte de las bacterias alrededor de las perforaciones con los diferentes tratamientos.	Milímetros.
Tratamiento	Cualitativa, Nominal, Politémica. Independiente.	Procedimiento empleado para tratar un producto.	Perforaciones impregnados con diferentes soluciones.	1 = AB macerado 100 %. 2 = DABSF 25 %. 3 = DABSF 50 %. 4 = DABSF 75 %. 5 = DABSF 100 %. 6 = DABF 25 %. 7 = DABF 50 %. 8 = DABF 75 %. 9 = DABF 100 %. 10 = Control positivo. 11 = Control negativo.

\*AB: *Agaricus bisporus*. DABSF: Dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar. DABF: Dilución de *Agaricus bisporus* filtrado.

## RESULTADOS

Al analizar las placas Petri que contenían *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fueron aplicados los distintos tratamientos (figura 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19), no se observó halo de inhibición, con excepción del control positivo realizado con clorhexidina al 0,12% (figura 20) (tabla 2, 3 y 4).

FIGURA 10. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada el agua destilada estéril como control negativo, no se observó halo de inhibición.

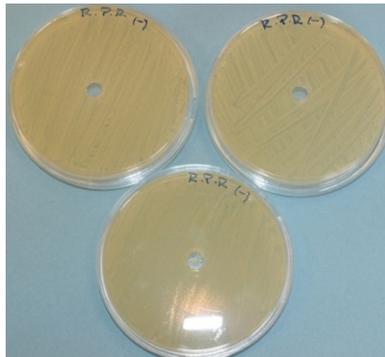


FIGURA 11. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicado el macerado de *Agaricus bisporus*, no se observó halo de inhibición.

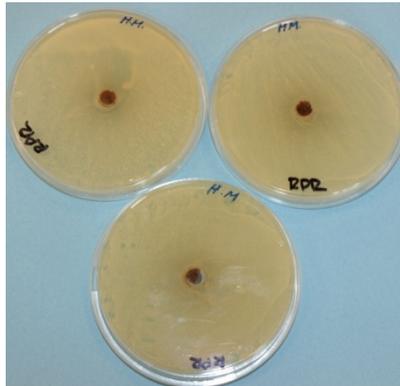


FIGURA 12. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 25%, no se observó halo de inhibición.

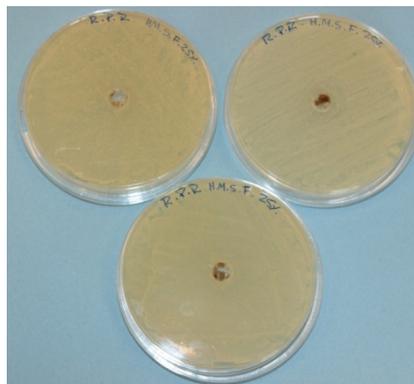


FIGURA 13. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 50%, no se observó halo de inhibición.

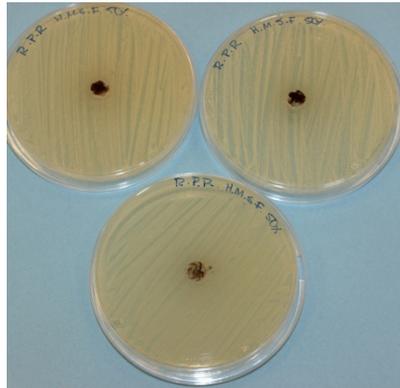


FIGURA 14. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 75%, no se observó halo de inhibición.

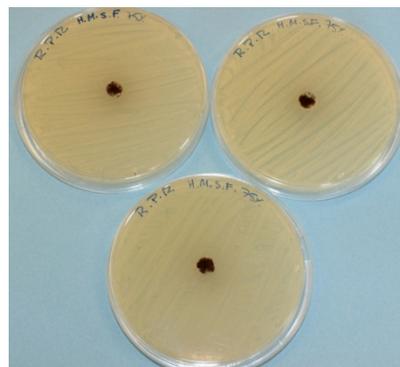


FIGURA 15. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 100%, no se observó halo de inhibición.

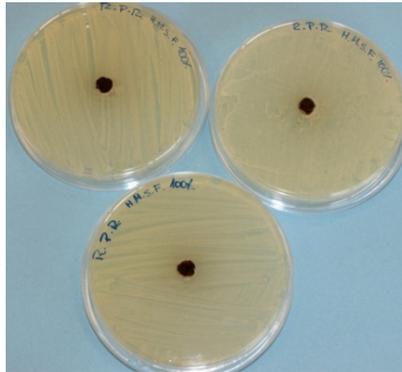


FIGURA 16. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrado al 25%, no se observó halo de inhibición.

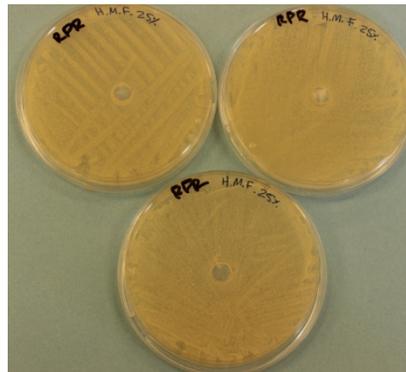


FIGURA 17. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrado al 50%, no se observó halo de inhibición.

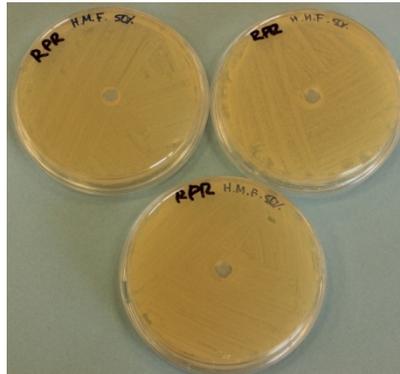


FIGURA 18. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrado al 75%, no se observó halo de inhibición.

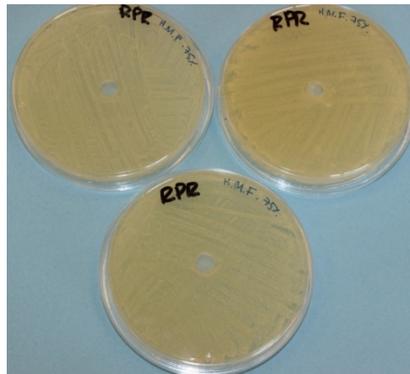


FIGURA 19. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la dilución del macerado de *Agaricus bisporus* filtrado al 100%, no se observó halo de inhibición.

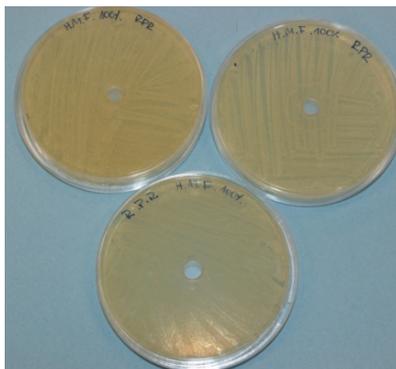


FIGURA 20. Placas Petri que contienen *Agar Rogosa* sembradas con *Lactobacillus* a las que fue aplicada la clorhexidina al 0,12% como control positivo, se observó halo de inhibición, con una media de 2,9 milímetros.

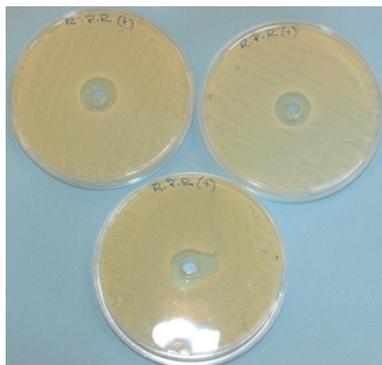


TABLA 2. Halo de inhibición (milímetros) en relación al macerado de *Agaricus bisporus* y controles sobre *Lactobacillus*.

Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	D.E.
<b><i>Agaricus bisporus</i> macerado 100%</b>	0	0	0	0
<b>Clorhexidina 0,12%</b>	2,6	3,2	2,9	0,3
<b>Agua destilada</b>	0	0	0	0

TABLA 3. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones del *Agaricus bisporus* sin filtrar y controles sobre *Lactobacillus*.

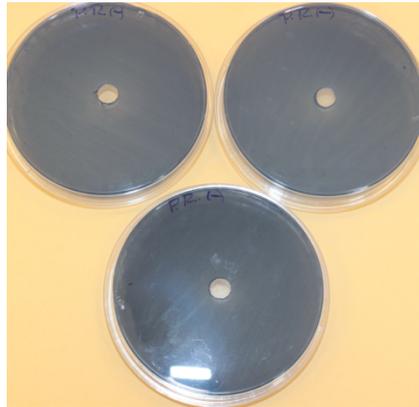
Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	D.E.
<b><i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 25%</b>	0	0	0	0
<b><i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 50%</b>	0	0	0	0
<b><i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 75%</b>	0	0	0	0
<b><i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 100%</b>	0	0	0	0
<b>Clorhexidina 0,12%</b>	2,6	3,2	2,9	0,3
<b>Agua destilada</b>	0	0	0	0

TABLA 4. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones de *Agaricus bisporus* filtrado y controles sobre *Lactobacillus*.

Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	D.E.
<b><i>Agaricus bisporus</i> filtrado 25%</b>	0	0	0	0
<b><i>Agaricus bisporus</i> filtrado 50%</b>	0	0	0	0
<b><i>Agaricus bisporus</i> filtrado 75%</b>	0	0	0	0
<b><i>Agaricus bisporus</i> filtrado 100%</b>	0	0	0	0
<b>Clorhexidina 0,12%</b>	2,6	3,2	2,9	0,3
<b>Agua destilada</b>	0	0	0	0

En las placas Petri que contenían *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans*, sí se presentaron halos inhibitorios en todos sus tratamientos y controles positivos. En cuanto al control negativo, no arrojó efecto alguno (figura 21).

FIGURA 21. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada el agua destilada estéril como control negativo, no se observó halo de inhibición.



El halo de inhibición de mayor diámetro para el macerado de *Agaricus bisporus* sin diluir sobre *Streptococcus mutans* fue de 3,2 milímetros, con una media de  $2,8 \pm 0,3$  milímetros y en los controles positivos el halo de inhibición de mayor diámetro fue 3,5 con una media de  $3,1 \pm 0,5$  milímetros (tabla 5) (figura 22 y 23).

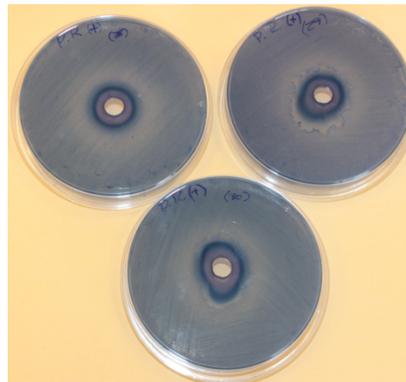
TABLA 5. Halo de inhibición (milímetros) en relación al macerado de *Agaricus bisporus* y controles sobre *Streptococcus mutans*.

Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	D.E.
<b><i>Agaricus Bisporus</i> macerado 100%</b>	2.6	3.2	2,8	0,3
<b>Clorhexidina 0,12%</b>	2,5	3,5	3,1	0,5
<b>Agua destilada</b>	0	0	0	0

FIGURA 22. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicado el macerado de *Agaricus bisporus*.



FIGURA 23. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la clorhexidina al 0,12% como control positivo, se observó halo de inhibición.



En las placas Petri con diluciones de *Agaricus bisporus* sin filtrar sobre *Streptococcus mutans*, se evidenció que el halo de inhibición de mayor diámetro fue en su concentración al 100%, con un diámetro de 7,5 milímetros, con una media de  $5,5 \pm 2,2$  milímetros (tabla 6) (figura 24, 25, 26 y 27).

TABLA 6. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones del *Agaricus bisporus* sin filtrar y controles sobre *Streptococcus mutans*.

Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	D.E.
<i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 25%	1,2	1,2	1,2	0
<i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 50%	1,5	1,7	1,5	0,1
<i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 75%	2	5,5	2,9	2,2
<i>Agaricus bisporus</i> sin filtrar 100%	3,1	7,5	5,5	2,2
Clorhexidina 0,12%	2,5	3,5	3,1	0,5
Agua destilada	0	0	0	0

FIGURA 24. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 25%. Se observan halos de inhibición.

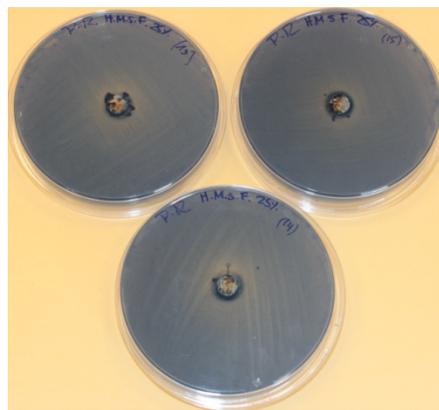


FIGURA 25. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 50%. Se observan halos de inhibición.

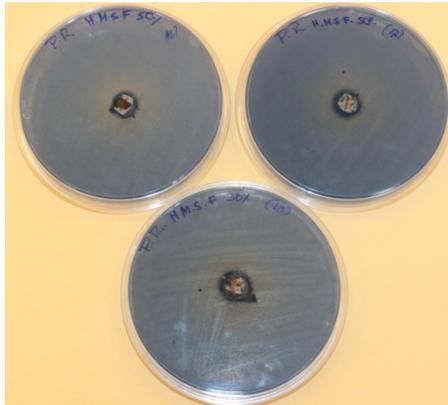


FIGURA 26. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 75%. Se observan halos de inhibición.

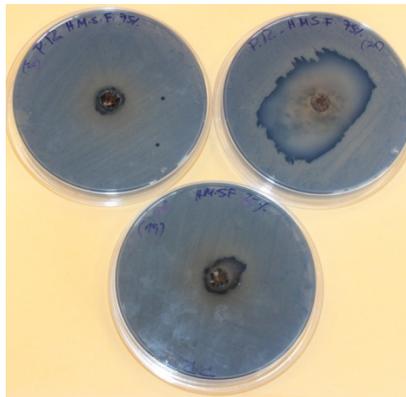
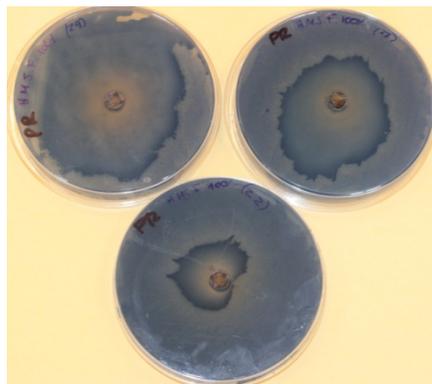


FIGURA 27. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* sin filtrar al 100%. Se observan halos de inhibición.



En las placas Petri con diluciones de *Agaricus bisporus* filtrado sobre *Streptococcus mutans*, se evidenció que el halo de inhibición con mayor diámetro fue en su concentración al 75% con una máxima de 5,2 milímetros y una media de 3 milímetros  $\pm$  1,9 milímetros, además, destacar que en su concentración más baja al 25 % hubo halo de inhibición con un máximo de 5 milímetros, con una media de  $3,4 \pm 1,6$  milímetros (tabla 7) (figura 28, 29, 30 y 31).

TABLA 7. Halo de inhibición (milímetros) en relación a la concentración de diluciones de *Agaricus bisporus* filtrado y controles sobre *Streptococcus mutans*.

Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	D.E.
<i>Agaricus bisporus</i> filtrado 25%	1,7	5	3,4	1,6
<i>Agaricus bisporus</i> filtrado 50%	1,7	4,5	2,6	1,5
<i>Agaricus bisporus</i> filtrado 75%	1,4	5,2	3	1,9
<i>Agaricus bisporus</i> filtrado 100%	1,9	2,5	2,2	0,3
Clorhexidina 0,12%	2,5	3,5	3,1	0,5
Agua destilada	0	0	0	0

FIGURA 28. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 25%. Se observan halos de inhibición.

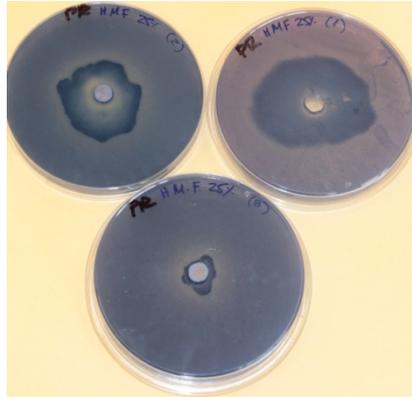


FIGURA 29. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 50%. Se observan halos de inhibición.

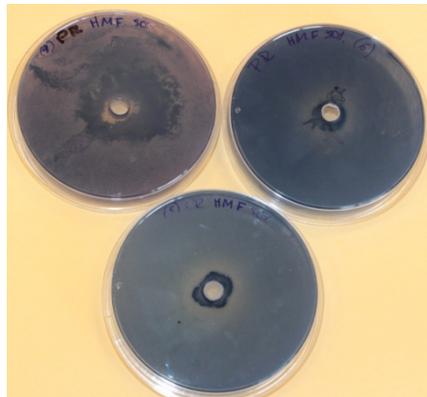


FIGURA 30. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 75%. Se observan halos de inhibición.

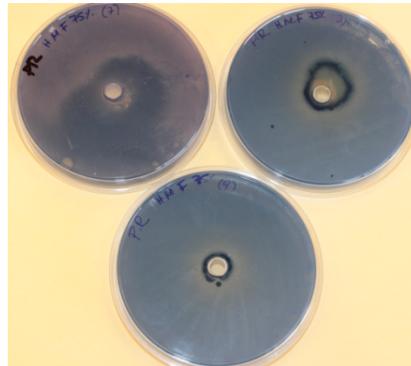
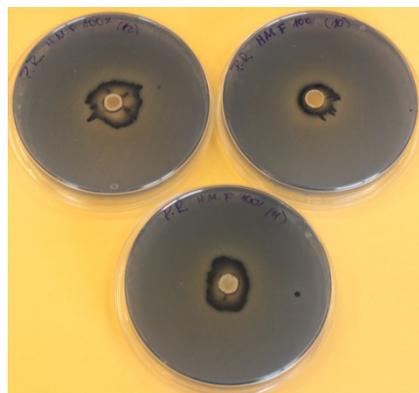


FIGURA 31. Placas Petri que contienen *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans* a las que fue aplicada la dilución de *Agaricus bisporus* filtrada al 100%. Se observan halos de inhibición.



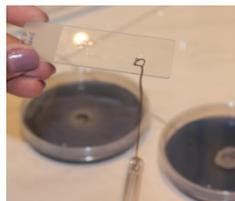
Una vez obtenidos los resultados se tomó una muestra con asa de siembra del contenido del halo inhibitorio de la dilución de *Agaricus bisporus* macerado sin filtrar al 100% y de la dilución de *Agaricus bisporus* macerado filtrado al 100% en cultivos de

*Streptococcus mutans* (figura 32), y fueron llevadas al portaobjetos para luego utilizar como primera aproximación de diferenciación microbiana una tinción de Gram (figura 33).

FIGURA 32. Placas Petri con *Agar Mitis Salivarius* sembradas con *Streptococcus mutans*, al lado izquierdo se encuentra la dilución de *Agaricus bisporus* macerado sin filtrar al 100% y en la derecha la dilución de *Agaricus bisporus* macerado filtrado al 100%.



FIGURA 33. Se llevó la muestra adquirida de los halos inhibitorios con un asa de siembra y se ubicó en porta objetos para cada una de las muestras.

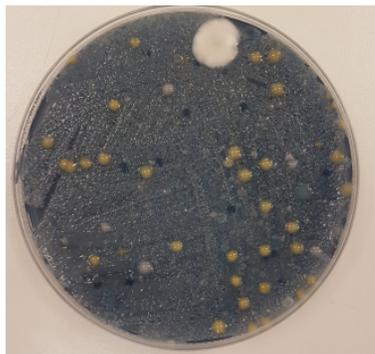


Al microscopio se observaron ambas muestras y se visualizó en ambos casos la presencia de bacterias gramnegativas, ya que la tinción fue de color rosa, además, se descartó la presencia de posibles levaduras en las muestras.

Luego se realizó un estudio extra tomando con un hisopo estéril una muestra de la superficie de *Agaricus bisporus* sin lavar y *Agaricus bisporus* lavado con agua destilada estéril y se realizó la siembra de estas muestras sobre una placa Petri con *Agar Mitis Salivarius* respectivamente. Al mismo tiempo en otra placa Petri con *Agar Mitis Salivarius* sembrada con *Streptococcus mutans*, que contenía una perforación se le agregó 150 micro litros de una disolución filtrada al 100% del macerado de *Agaricus bisporus* lavado con agua destilada estéril con el fin de comparar los resultados obtenidos en el primer experimento.

Pasado los 5 días, en jarra de anaerobiosis, se observó en la placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Agaricus bisporus* sin lavar con agua destilada estéril crecimiento de microorganismos (figura 34).

FIGURA 34. Placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Agaricus bisporus* sin lavar con agua destilada estéril. Se observa el crecimiento de variados microorganismos.



Al contrario de la placa Petri sembrada con *Agaricus bisporus* lavado con agua destilada estéril, donde no se observó crecimiento de microorganismo alguno (figura 35).

FIGURA 35. Placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Agaricus bisporus* lavado con agua destilada estéril. No se observa crecimiento de microorganismos.



La otra placa Petri con *Agar Mitis Salivarius* sembrada con *Streptococcus mutans* que contenía la disolución filtrada al 100% se observó sólo una decoloración del *Streptococcus mutans*, que no afectó en su crecimiento (figura 36).

FIGURA 36. Placa Petri con *Agar Mitis Salibarius* sembrada con *Streptococcus mutans* a la que se le aplicó en la perforación la dilución del macerado de *Agaricus bisporus* filtrado y lavado con agua destilada estéril. Se observa decoloración que no afecta al crecimiento del *Streptococcus mutans*.



Los resultados en general demuestran que sí hay efecto antibacteriano in vitro del *Agaricus bisporus* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* y no para *Lactobacillus*, además se logró determinar que el efecto antibacteriano del *Agaricus bisporus* en el crecimiento de *Streptococcus mutans* fue de tipo bacteriostático y que su efecto se mantiene frente a las concentraciones mínimas inhibitorias de *Agaricus bisporus* filtrado al 25% y sin filtrar al 25%.

## **DISCUSIÓN**

Los resultados evidenciados en este estudio, revelaron que el *Agaricus bisporus* no demostró efectividad antibacteriana frente a cultivos de *Lactobacillus*, sin embargo, frente a cultivos de *Streptococcus mutans* demostró efectividad en todas las concentraciones.

Según Alves & cols. (2012) hay que tener en consideración que existe una gran cantidad de datos disponibles en la literatura que indican actividad antimicrobiana de los extractos de hongos contra bacterias grampositivas y que en específico, especies del

género *Agaricus* han demostrado actividad antimicrobiana al igual que los resultados obtenidos en este estudio.

Cabe destacar, que se obtuvieron resultados similares en investigaciones con extractos de la especie *Agaricus blazei*, donde se identificaron inhibición de bacterias grampositivas como *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* (Lima, Gris & Karnikowski, 2016), siendo esta última una de las cepas bacterias analizadas en este estudio y con los resultados más relevantes.

Según Mohamed (2012) el *Agaricus bisporus* tiene muchos metabolitos medicinales responsables de su actividad terapéutica como agentes anticancerosos, agentes anti-colesterol, agentes antimicrobianos (agaritina y alcoholes); agente protector de hepato y metabolitos potenciadores del sistema inmunitario.

Los halos de inhibición fueron de tipo bacteriostático, y a diferencia de los halos de inhibición de tipo bactericida en controles positivos, se observó un crecimiento de otro tipo de comunidad microbiana asociada al *Agaricus bisporus* y al mismo tiempo, una disminución en el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Esto refleja que la comunidad microbiana acompañante del *Agaricus bisporus* sin ser lavado con agua estéril, compite con el crecimiento de colonias del *Streptococcus mutans* promoviendo una especie de actividad antagónica o de competencia, inhibiendo su crecimiento. Además la identificación de esta flora acompañante queda abierta a otros estudios, ya que podría ser de gran utilidad para su utilización como tratamiento de tipo probiótico contra la caries dental, ya que promueven la salud mediante la exclusión competitiva o positiva de las

bacterias patógenas y la utilización de probióticos en cavidad bucal, para el control y prevención de enfermedades, requieren de bacterias con gran potencial de competencia, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos patógenos y permaneciendo en el sitio de la cavidad bucal (Zalba & Flichy-Fernández, 2013).

La investigación sobre los hongos es extensa y cientos de especies han demostrado un amplio espectro de actividades farmacológicas, incluida la actividad antimicrobiana. De hecho, existe una brecha en la identificación de los compuestos individuales responsables de esas propiedades, y sólo se han descrito algunos compuestos de bajo peso molecular y algunos péptidos y proteínas. Estos metabolitos de hongos u otros compuestos relacionados podrían usarse para desarrollar fármacos efectivos contra microorganismos patógenos resistentes a los tratamientos convencionales (Alves & cols., 2012).

Además, se debe tener en cuenta que en estos tipos de estudios la gran variabilidad de resultados que se pueden obtener, debido a la influencia de múltiples factores ambientales y metodológicos. El tipo y la cantidad de constituyentes bioactivos pueden variar según el método de cultivo, las condiciones climáticas y del suelo, el uso de hongos crudos o deshidratados, cocidos o fritos, el tipo de extracción por solvente, metodología empleada para la preparación de las soluciones y el procedimiento de almacenamiento y manipulación. (Lima, Gris & Karnikowski, 2016)

## CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio realizado y el análisis de los resultados se puede concluir que el *Agaricus bisporus* no demostró efectividad antibacteriana frente a cultivos de *Lactobacillus*, sin embargo, frente a cultivos de *Streptococcus mutans* demostró efectividad en todas las concentraciones y además, su efecto se mantuvo en las concentraciones mínimas inhibitorias.

Los halos de inhibición son de tipo bacteriostático, y a diferencia del halo que se observa en los controles positivos, hay un crecimiento de otro tipo de comunidad microbiana asociada al *Agaricus bisporus* y que al mismo tiempo provoca una disminución en el crecimiento de *Streptococcus mutans*. La micro flora acompañante del *Agaricus bisporus* sin ser lavado, compite con el crecimiento de colonias del *Streptococcus mutans*, promoviendo una actividad antagónica y en este caso beneficiosa controlando la formación de una de las cepas bacterianas más patógenas dentro de la cavidad bucal.

Estos resultados y la actividad antimicrobiana que demostró el *Agaricus bisporus*, es de gran relevancia y aporte en la búsqueda de nuevos mecanismos terapéuticos y/o preventivos, para evitar el uso de técnicas invasivas que llevan al sacrificio de tejido dentario.

Se sugiere realizar nuevos estudios, resolviendo las nuevas preguntas de investigación que surgen, enfocadas en determinar si la microflora acompañante es el único mecanismo responsable de los efectos bacteriostáticos del *Agaricus bisporus* frente a las colonias de *Streptococcus muntans*, o si también participan otros compuestos, sustancias o agentes antibacterianos que aún no se han identificado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M., Ferreira, I., Díaz, J., Teixeira, V., Martins, A. & Pintado, M., (2012). A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Planta Med.* Vol. 78(16), 1707-1718.
- Andrade, M., Jesús, J., Vieira, F., Viana, S., Spoto, M., & Minhoni, M., (2014). Effect of gamma irradiation on the nutritional quality of agaricus bisporus strains cultivated in different composts. *anais da academia brasileira de ciências*, Vol. 86(2), 897-906.
- Butorovic, F., (2012). Estudio comparativo in vitro de la resistencia adhesiva de restauraciones indirectas de resina compuesta con y sin silanizado previo. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112776/butorovic%20pozo%20francis%20co.pdf?sequence=1>
- Castro, V., (2005). Inhibición del crecimiento in vitro de streptococcus mutans por papaína y sanitrend. Tesis de Maestría, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2005/castro\\_v/sources/castro\\_v.pdf?origin=publication\\_detail](http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2005/castro_v/sources/castro_v.pdf?origin=publication_detail)
- Díaz, J., Jans, A., & Zaror, C., (2017). Efectividad de la Remoción Parcial de Caries en Molares Primarios con Lesiones de Caries Profunda. Ensayo Clínico Aleatorizado. *International journal of odontostomatology*, Vol. 11(4), 443-449.
- Echeverría, S., Herrera, O., Henríquez, E., Sepúlveda, R. & Maldonado, P., (2012). Prevalencia de caries temprana de la infancia en niños con enfermedades respiratorias crónicas. *Revista chilena de pediatría*, Vol. 83(6), 563-569.
- Fernández, C. (2016). Una de las enfermedades más prevalentes del mundo no es transmisible y puede ser controlada. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, Vol. 9(2), 175-176
- Figuroa, M., Alonso, G. & Acevedo, AM., (2008). Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta odontológica venezolana*, Vol. 47(1).
- Giacaman, R., Muñoz, C., Bravo, E., & Farfán, P., (2013). Quantification of caries-associated bacteria from saliva of adults and older adults. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 6(2), 71-74.
- Gutiérrez, D., Alós, L., García, F. & González, A., (2006). Microbiología de la caries radicular en el paciente mayor. *Avances en Odontostomatología*, Vol. 22(2), 125-130.
- Hidalgo, I., Duque de Estrada, J. & Pérez, J., (2008). La caries dental. Algunos de los factores relacionados con su formación en niños. *Rev Cubana Estomatol.* Vol. 45(1).
- Lima, C., Gris, E. & Karnikowski, M., (2016). Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 26(6), 780-786.
- Llauradó, G., Morris, H., Albear, J., Castán, L., & Bermúdez, R., (2011). Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, Vol. 30(4), 511-527.
- Martínez, M., Morales, S. & Martínez, C., (2013). Caries dental en adultos jóvenes en relación con características microbiológicas y fisicoquímicas de la saliva. *Rev. salud pública*. Vol. 15(6), 867-877.

- Mohamed, E., (2012). Chemical profile, agaritine and selenium content of *Agaricus bisporus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 55(6), 911-920.
- Núñez, D., & García, L., (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, Vol. 9(2), 156-166.
- Ojeda, J., Oviedo, E. & Salas, L., (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *Revista CES Odontología*. Vol. 26 (1), 120 – 971.
- Palomer, L., (2006). Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. *Revista chilena de pediatría*, Vol. 77(1), 56-60.
- Rizzo, L., Torres, A. & Martínez, C., (2016). Comparación de diferentes técnicas de cepillado para la higiene bucal. *Revista CES Odont*, Vol. 29(2), 52-64.
- Serra, M., (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, Vol. 16(3), 402-419.
- Souza, E., (2010). Cultivo de hongos en Brasil: desafíos y potencial de crecimiento. *Ciência e Agrotecnología*, Vol. 34(4), 795-803.
- Vinhal, J., Vinhal, R. & Carvalho, M., (2012). Mushrooms of the genus *Agaricus* as functional foods. Vol. 27(4), 1017-1024.
- Zalba, E. & Flichy-Fernández, A., (2013). Empleo de probióticos en odontología. *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 28(1), 49-50.
- Zanes, R. & Teixeira, H., (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Food Science and Technology*, Vol. 27(1), 154-157

