

EFFECTO *IN VITRO* DEL CONCENTRADO DE CRANBERRY (*Vaccinium macrocarpon*) SOBRE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE *Streptococcus mutans*

POR: NATALIA CATALINA MALLEA PARKER

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

**PROFESOR GUÍA
MICROBIOLOGO. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNIVERSIDAD DEL
DESARROLLO, CONCEPCIÓN. FERNANDO SALGADO C.**

**Diciembre 2010
CONCEPCIÓN**

Dedicado a mi familia...

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi familia por su apoyo y fe incondicional, a, Señora Reinela Muñoz y

Marcela Aguilera por su paciencia y cooperación

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Gráfica, medianas de los grados de adherencia según la concentración de Cranberry aplicada.....	20

RESUMEN

El presente estudio de tipo experimental aborda el área de la prevención en salud oral. Específicamente determina el efecto de la aplicación de concentrado de Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) sobre la capacidad de adherencia del *Streptococcus mutans* a las paredes de tubos de ensayo. Método: Se aplicó Cranberry en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25%, a los tubos con caldo de cultivo *tripticase* con 1% de sacarosa que a su vez fueron inoculados con *Streptococcus mutans*, previamente aislado desde muestras de pacientes de la clínica odontológica de la Universidad Del Desarrollo en agar *mitis salivarius* con 20% de sacarosa. Posteriormente al cultivo de los tubos con el Cranberry por 24 horas se aplicó cristal violeta al 1% y se midió el grado de adherencia de bacterias a la superficie interna de estos tubos de ensayo. Resultados: Se observó que existe diferencia en los grados de tinción según concentraciones aplicadas, pudiéndose apreciar para la concentración de 100% ($M_e=1.00$), 75% ($M_e=1.00$) seguido por 50% ($M_e=3.00$) y 25% ($M_e=3.00$). Mediante el análisis de Kruskal-Wallis se obtuvo; $X^2=15.779$, $df=5$, $p=0,008$, lo que arrojó que la aplicación de concentrado de Cranberry es significativa frente al control negativo. Según la prueba de DUNN, existen diferencias significativas entre cada concentración por separado. Por lo tanto Los resultados mostraron que el Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*), tiene efecto sobre la adherencia del *Streptococcus mutans*, dependiendo de la concentración aplicada. Debido al efecto del concentrado de Cranberry sobre la capacidad de adherencia del *Streptococcus mutans*, se presenta a este fruto como una alternativa natural a potenciar en el área de la prevención de las infecciones de la cavidad oral.

INTRODUCCIÓN

En Chile, la caries dental es considerada uno de los principales problemas de Salud Pública, debido a su alta prevalencia y severidad. Según el Ministerio de Salud (MINSAL), un 84.7% de la población entre 6 y 8 años presenta evidencias clínicas de caries y un 84.3% de la población de 12 años (Urbina, T., Caro, J.P. & Vicent, M. 1999). Sin embargo, en la población adulta, la prevalencia de caries puede llegar hasta 100% (Gamonal, 1996). El objetivo de este estudio fue determinar de manera *in Vitro* si es que el concentrado de Cranberry, (*Vaccinium Macrocarpon*) tiene efecto antiadherente sobre el *Streptococcus mutans* que forma parte de la flora normal de la cavidad oral y es pilar de la placa bacteriana, productora de la caries dental. Esta bacteria además de poseer los mecanismos clásicos para adherirse (carga eléctrica negativa, fimbrias, ácido lipoteicoico y glicocálix) también posee polímeros extracelulares, que aumentan su adherencia a la superficie donde se ubica. Dichos polímeros son conocidos con el nombre de dextranos y glucanos, los cuales son sintetizados por el complejo de enzimas glucosiltransferasas, (Jin X., YuLing Z., Yuan L., JiYao L., YuQing H. & XueDong Z. 2007). De estos, el de mayor importancia es el dextrano, por su estructura química, que posee enlaces 1-3, dando una estructura en forma de cadena, insoluble en la cavidad bucal y que otorga la capacidad de adherencia a las superficies lisas de las piezas dentarias, (Salazar, L. A, Medina F., Donoso F.; Barrientos L. & Sanhueza A. 2009). El interés por comprobar la influencia que tendría el concentrado del Cranberry sobre la capacidad de adherencia del *streptococcus*

mutans, se fundamenta sobre la presencia de proantocianidinas, una categoría muy específica de flavonoides (polifenoles), los que se consideran inhibidores de la adherencia bacteriana, esto porque reducen la hidrofobicidad del *Streptococcus mutans*, (Koo H., Duarte S., Murata R.M. & Scott-Anne K. 2010), además el Cranberry dentro de su estructura contiene taninos que inhiben la síntesis de dextranos. Todo con el objetivo de atacar el problema de la formación de placa y específicamente producción de caries dirigiendo los efectos hacia el más poderoso factor de virulencia del *Streptococcus mutans*, que radica en su capacidad de adherencia.

Este estudio aborda un tema escasamente documentado por lo que los resultados obtenidos constituyen un aporte al ámbito de la prevención en odontología. Además por el hecho de tratarse de un producto natural se amplía la posibilidad de utilizarlo como medio colaborador en el combate de placa bacteriana y la formación de caries. Esto podría producirse a través de su incorporación en pastas dentales o produciendo colutorios en base al Cranberry, además de obtener fuentes alternativas y más económicas de agentes que disminuyan la carga bacteriana en boca, estimulando e incentivando a aumentar el consumo de elementos con contenidos de Cranberry.

Como objetivos específicos se logró determinar la adherencia del *Streptococcus mutans* a superficies de tubos de ensayo según concentraciones de Cranberry aplicadas y por otra parte se comparó la adherencia del *Streptococcus mutans* a los tubos de ensayo luego de la aplicación de diferentes concentraciones de Cranberry.

MARCO TEÓRICO

La placa bacteriana ha sido implicada como el principal factor etiológico en la caries dental y de enfermedades periodontales. (Jagtap & Karkera, 2000).

En la placa dental cohabitan gran cantidad de microorganismos con diferentes propiedades que les permiten coexistir, madurar y establecerse. (Steinberg D., Feldman M., Itzhak O. & Ervin I. 2004). Entre estos microorganismos encontramos al *Streptococcus mutans*, una es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. Es acidófilo debido a que vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares, como glucocalix, (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentarias) e intracelulares (metabolismo energético), (Gregoire S., Singh A.P., Vorsa N. & Koo H. 2007). En estado de salud, un recuento de estas bacterias en boca será de menos de 100.000 UFC. Su capacidad de adherencia es su principal factor de virulencia. Estas bacterias son capaces de provocar la pérdida de minerales y posterior formación de una cavidad debido al desequilibrio iónico en el proceso de desmineralización de los tejidos duros del diente, resultante del metabolismo de carbohidratos por parte de estas bacterias, dando origen a la caries dental. Chile se caracteriza por tener una alta prevalencia de caries, tanto a nivel adulto como infantil, contando con una prevalencia

de un 84.7% de la población entre 6 y 8 años presenta evidencias clínicas de caries y un 84.3% de la población de 12 años (Urbina, 1999).

Actualmente existe amplio conocimiento del desarrollo y evolución del proceso carioso, concluyendo que se trata básicamente de un proceso multifactorial, indicándose al *Streptococcus mutans* como el principal microorganismo involucrado en la formación de la caries.

Así mismo existe una serie de medidas preventivas para el control de la placa dental y día a día se incrementan los estudios relacionados con las sustancias naturales, también llamadas fitoterapias, que complementan eficazmente el tratamiento convencional de patologías que afectan a los seres humanos y en algunos casos hasta reemplazan (Moromi Nakata et al, 2007). Siendo utilizados en esta área elementos como la manzanilla, el aloe vera, té verde, etc.

En el estudio de sustancias con propiedades antibacterianas y antiadherentes, encontramos al Cranberry, propiedades que se atribuyen a su alto contenido de polifenoles. (Ervin I., Weiss, D.M.D., Lev-Dor R., Kashman J., Goldhar J., M.D., Sharon N. & Ofek I. 1998)

El cranberry es un pequeño fruto rojo perteneciente al mismo género del arándano azul, blueberry, tradicionalmente el cranberry era recolectado y consumido por los indios de America. Históricamente, los frutos de Cranberry y sus hojas han sido utilizados en el tratamiento de trastornos urinarios, (Navindra P. 2008). Más recientemente, el Cranberry ha sido usado para prevenir infecciones de la cavidad oral, a raíz de esto ya se estudian sus propiedades antibacterianas y antiadherentes.

La actividad biológica del Cranberry es más bien el resultado de la compleja mezcla de flavonoides en lugar de un solo compuesto activo. En efecto el Cranberry contiene proantocianidinas, una categoría muy específica de flavonoides (polifenoles), los que se consideran inhibidores de la adherencia bacteriana, esto porque reducen la hidrofobicidad del *Streptococcus mutans*, además el Cranberry dentro de su estructura contiene taninos que inhiben la síntesis del dextranos. Estas proantocianidinas (también llamadas “taninos condensados”), que también se encuentran en menor concentración en el té y el chocolate son sustancias que como todos los polifenoles, poseen efectos antioxidantes sobre las células del organismo, además del efecto antiadherente, anteriormente mencionado.

En el presente estudio se determinará *in Vitro* el efecto de diferentes concentraciones de concentrado de cranberry sobre la adherencia del *Streptococcus mutans* a la superficie interna de tubos de vidrio.

Este estudio se fundamenta sobre la necesidad de obtener fuentes alternativas y más económicas de agentes que disminuyan la carga bacteriana en boca, estimulando el consumo de elementos con contenidos de Cranberry y por ende disminuir el riesgo cariogénico en los pacientes.

HIPÓTESIS DEL PROYECTO

El concentrado de Cranberry, tiene efecto sobre la capacidad de adherencia del *Streptococcus mutans*, *in Vitro*.

OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto del concentrado de Cranberry sobre la adherencia del *Streptococcus mutans*, *in Vitro*.

Específicos:

Determinar la adherencia del *Streptococcus mutans* a superficies de tubos de ensayo según concentraciones de Cranberry aplicadas.

Comparar la adherencia del *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones de Cranberry.

MATERIALES Y METODOS

El diseño de la investigación considerara un estudio cuantitativo de tipo experimental.

Cepas:

Se utilizó cepas de *Streptococcus mutans* obtenidos del cepario del laboratorio de microbiología de la Universidad del Desarrollo Concepción. Las que fueron cultivadas en las siguientes condiciones Se preparó 27g de caldo mitis salivarius, selectivo para *Streptococcus mutans* más 5.4g de sacarosa en 300 ml de agua destilada en un Matraz Erlenmeyer autoclaveable, una vez realizada la mezcla con bagueta se utilizó un tapón de algodón hidrófobo más papel craft el cual fue sellado con un indicador de autoclave. Posterior a este procedimiento se autoclavó el caldo en este procedimiento dura aproximadamente 1 hora a una temperatura de 120°C.

Preparación de inóculo bacteriano:

Se tomaron las bacterias de cepario de la Universidad del Desarrollo Concepción por arrastre con un asa estéril, y se traspasaron a un tubo con 3 ml de suero fisiológico estéril, se ajustó la suspensión por comparación visual hasta llegar a la misma turbidez del estándar de 0.5 de la escala de Mc. Farland (La que se preparó con 0.5 ml de 1% de cloruro de Bario a 99,5ml de 1% de ácido sulfúrico, estos se agitaron para mantener en suspensión), lo que es un índice que estamos frente a una concentración de 1×10^8 UFC por ml, se debió agitar muy bien el estándar de turbidez antes de proceder a la comparación, con esto se logró estandarizar la muestra bacteriana (1×10^8) y se

trabajó con una concentración idéntica de esta en todos los cultivos, se aplicó a cada tubo con caldo *mitis salivarius* con 20% de sacarosa 100 uL del caldo bacteriano.

El diseño de la investigación considerara un estudio cuantitativo de tipo experimental.

Se estudió los efectos de diferentes concentraciones Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*), sobre la adherencia de *Streptococcus mutans* a la superficie interna de tubos de ensayo.

Para evaluar estos efectos se aislaron previamente, cepas obtenidas del cepario existente en el laboratorio de microbiología de la Universidad Del Desarrollo, en tubos con caldo *mitis salivarius* con 20% de sacarosa y cultivadas en jarra GasPak en condición de microaerobiosis por 48horas a una temperatura de 37°C, (Cooper H., Mondaca M. A. & Herrera R. 1988).

Se procedió a filtrar al vacío el concentrado de Cranberry obtenido y producido por Bayas Del Sur S.A, para eliminar cualquier sedimento que pudiese ensuciar las muestras. Luego se realizaron diluciones del concentrado obtenido, ya filtrado añadiendo paulatinamente, agua destilada estéril hasta obtener concentraciones de 75%, 50% y 25%.

Se requirió de 18 tubos de ensayo de vidrio de borosilicato con tapa rosca. En condiciones estériles, se acondicionaron tubos con 10 mL de caldo de cultivo tripticasa enriquecido con 1% de sacarosa, el cual se utilizó como medio de cultivo para la realización del ensayo propiamente tal, como control positivo se utilizó Lauril sulfato de sodio, como sustancia antiadherente y como control negativo se contó con agua destilada. Contando con un control negativo y uno positivo en cada batería.

Posteriormente se inoculó cada tubo con 1000µl de la bacteria previamente aislada y estandarizada según Mc Farland al 0.5 y 1000µl de concentrado de Cranberry, en concentraciones previamente obtenidas, de 100%, 75%, 50%, 25% respectivamente, se realizó el control positivo al cual se le añadió 1000µl de lauril sulfato de sodio, como agente antiadherente y un control negativo al cual se le agregó 1000µl de agua destilada estéril para no afectar la adherencia de las bacterias a las paredes internas del tubo de ensayo.

El procedimiento fue realizado en triplicado por lo cual se contó con tres tubos por concentración. Todos los tubos fueron cultivados en jarras GasPak en condiciones de microaerobiosis por 24 horas a 37°C. (Cooper H. *et. al.* 1988, p.23) en posición inclinada.

Posterior a las 24h de cultivo los tubos de ensayo en cuestión fueron agitados en Vortex V1 plus, por 5s (Murshison H., Larrimore S. & Curtis R. 1985), esto para desprender las bacterias no adheridas al vidrio, el sobrenadante fue eliminado en recipientes especiales para desechos biológicos.

Para cuantificar la adherencia se procedió a teñir cada tubo con cristal violeta al 1% y a lavar los tubos con agua destilada para eliminar los excesos de tinción.

Luego se clasificaron los tubos según el grado de adherencia a la superficie de vidrio asignándoles valores de entre 0 y +4, así se considerará: 4, capa gruesa de células confluentes en las paredes y en el fondo del tubo; 3, capa fina de células confluentes en las paredes y en el fondo del tubo; 2, capa fina de células confluentes adheridas al tubo; 1, muy pocas células adheridas al fondo del tubo; y 0, no hay tinción (adherencia)

visible. Previo a esto se realizó un entrenamiento visual con el fin de cuantificar y clasificar adecuadamente los tubos según adherencia bacteriana a sus paredes internas.

RESULTADOS

La realización del experimento muestra luego de la tinción, que el concentrado de Cranberry tiene efecto antiadherente sobre las paredes internas de tubos de ensayo. Además, todas las concentraciones de Cranberry investigadas (25, 50, 75 y 100%) produjeron inhibición en la adherencia del *streptococcus mutans*, en diferentes magnitudes (figura 1). El mayor efecto antiadherente se observó en las concentraciones de 75 y 100%. Se analizaron los resultados y se obtuvo las medianas de los grupos de estudio que mostraban para el control negativo ($M_e=4.00$), para la concentración de 25% ($M_e=3.00$), 50% ($M_e=3.00$), 75% ($M_e=1.00$), seguido por la concentración de 100% ($M_e=1.00$) y para el control positivo ($M_e=0.00$), (figura 1.).

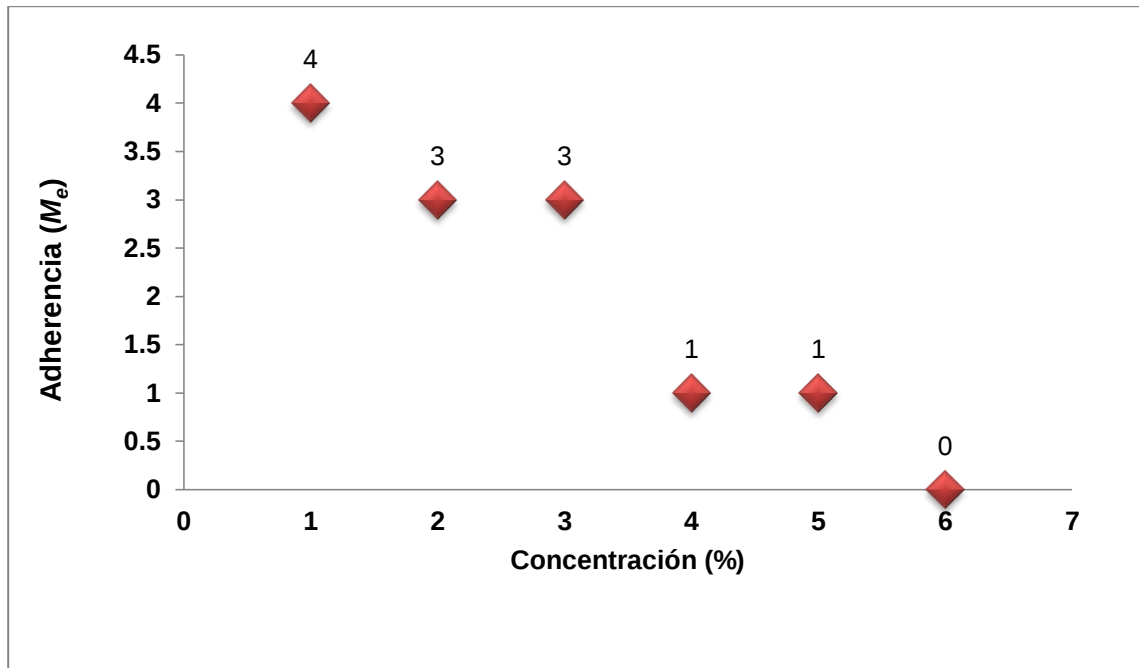


Figura 1. La gráfica muestra las medianas de los grados de adherencia obtenidos en cada grupo de muestras según la concentración de Cranberry aplicada.

En base a estos resultados se optó por realizar análisis no paramétricos, usando la prueba de Kruskal-Wallis para k muestras independientes, para comprobar si existían diferencias entre los 6 grupos estudiados, lo cual arrojó significancia en los resultados ($p=0.008$). Además se determinó mediante la prueba estadística de DUNN que existen diferencias significativas entre los grupos estudiados, es decir, entre una concentración y otra siempre hay variación en los resultados por lo que no se obtendrán los mismos niveles de adherencia aplicando Cranberry al 25, 50, 75, o 100% y comparando los grados de adherencia obtenidos, entre sí.

DISCUSIÓN

Luego del análisis de datos se determinó que existen diferencias significativas entre las aplicación de concentrado de Cranberry a tubos de ensayo con cultivo de *S. mutans* y el control negativo.

Los resultados obtenidos del estudio que fueron mencionados (Figura 1) serán aportes que nos permiten ampliar el campo de análisis, incidiendo aún más favorablemente en la efectividad de las proantocianidinas (PAT), presentes en elevadas concentraciones en el Cranberry, frente a los fenómenos de adhesión y a la supervivencia de macromoléculas de interés biológico determinada en períodos de corto tiempo y posiblemente a la disminución de la actividad del sistema GTFs. (Koo H. *Et al.* 2010).

Los resultados del presente trabajo mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la reducción de adherencia con relación al control negativo.

La investigación científica actual sugiere que el Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) puede proporcionar grandes beneficios a nuestra salud en otras partes del cuerpo. Mientras que la investigación está todavía en desarrollo, es interesante considerar la importancia del Cranberry, (*Vaccinium macrocarpon*) como una herramienta prometedora en la lucha natural contra las bacterias que atacan el organismo humano ya que es un producto natural y su consumo no produce efectos adversos en el organismo.

CONCLUSIONES

La prueba de Kruscal-Wallis, con un $p=0.008$, demuestra que los resultados del estudio son estadísticamente significativos, por lo cual se prueba que el concentrado de Cranberry afecta la capacidad de adherencia del *Streptococcus mutans*. Con estos resultados se posiciona al Cranberry como agente antiplaca, con potencial para ser utilizado y en la lucha contra la estabilización de la placa bacteriana y la formación de caries. Aún hace falta mayor investigación en el área, con el objetivo de posicionar al Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*), como una alternativa indiscutible y de origen natural, en el área de la prevención en salud oral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cooper H.; Mondaca M. A.Y Herrera R. (1988). Capacidad de adherencia *in vitro* en diferentes biotipos de *streptococcus mutans*. Acta Microbiológica. Vol. 1 (2) pp.21-26.

Ervin, I.Weiss, D.M.D.; Roni Lev-Dor , D.M.D.; Yoel Kashman, PH.D.; Janina Goldhar, M.D.; Nathan Sharon, PH.D.; Itzhak Ofek, PH.D.(1998). Inhibiting interspecies coaggregation of plaque bacteria with a cranberry juice constituent. *Journal of the American Dental Association* 129, 1719-1723.

Gamonal, J.(1996) Prevalencia de enfermedades periodontales y de caries dental en la población de 35-44 y de 65-74 años de nivel socio-económico bajo y medio-bajo de la provincia de Santiago, Región Metropolitana, y determinación de los recursos humanos necesarios para su tratamiento. Rev. Facultad Odontología. Univ. Chile, 14(1):56-7.

Gregoire S., Singh A.P., Vorsa N. & Koo H. (2007). Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Jagtap AG; Karkera SG. (2000). Extract of Juglandaceae regia Inhibits Growth, In-vitro Adherence, Acid Production and Aggregation of *Streptococcus mutans*. *J Pharm Pharmacol*, 52(2): 235-42

Jin X.; YuLing Z.; Yuan L.; JiYao L.; YuQing H.; XueDong Z. (2007). Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on glucosyltransferases, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*, (Vol. 36, Issue 12, Pages 999-1004).

Koo H., Duarte S., Murata R.M., Scott-Anne K. (2010). Influence of Cranberry Proanthocyanidins on Formation of Biofilms by *Streptococcus mutans* on Saliva-Coated Apatitic Surface and on Dental Caries Development in vivo. *Caries Research*, (44), 116-126.

Murshison H.; Larrimore S.; Curtis R. (1985) In vitro inhibición of Adherence of *Streptococcus mutans* Strains by Nonadherent Mutans of *S. mutans* 6715. *Infection and Immunity*. Vol 50 (3) pp. 826-832.

Navindra P, (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (3), pp. 627–629.

Salazar L. A.; Medina F.; Donoso F.; Barrientos L. & Sanhueza A. (2009). Acción antimicrobiana in vitro de la miel de abejas sobre los microorganismos cariogénicos estreptococos del grupo mutans. *Int. J. Morphol.*, 27(1):77-82.

Steinberg D.; Feldman M.; Itzhak Ofek and Ervin I. Weiss. (2004). Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.54, 86-89.

Urbina, T.; Caro, J.P. & Vicent, M. Caries y fluorosis en niños de 6 a 8 años y 12 años. MINSAL, Chile. Departamento de Estadísticas e Información. 1996-1999.