



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TESIS DE MAESTRIA

“Concentración Mínima Inhibitoria de Antisépticos con Gluconato de Clorhexidina Comerciales y Extracto de Guayaba Brasileña (*Acca sellowiana*) en Muestras de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans*”

PRESENTA
DIEGO PINONCELY NOVAL

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO, JUNIO 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TESIS

Concentración Mínima Inhibitoria de Antisépticos con Gluconato de Clorhexidina Comerciales y Extracto de Guayaba Brasileña (*Acca sellowiana*) en Muestras de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans*

PRESENTA
DIEGO PINONCELY NOVAL

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ OBED GARCÍA CORTÉS

CO-DIRECTORES
JAIRO MARIEL CÁRDENAS
ASESORES
ABRAHAM ESCOBEDO MORATILLA
ANA MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ AMARO
MARLENE GUADALUPE VITALES NOYOLA
FRANCISCO JAVIER GUTIÉRREZ CANTÚ
ALETHIA MUÑÍZ RAMÍREZ
JUNIO 2021

Dedicatorias

A mis padres Juan Francisco y María Isabel, a mi hermano Juan Francisco y mi abuela Victoria por ser pilares en mi vida y apoyo fundamental para todos mis logros personales, a todos mis amigos dentro y fuera de la maestría por haber contribuido en mi crecimiento y tenerme tanta paciencia durante éste proceso, a todos mis maestros por ayudar a construir el ser humano que hoy soy y sobre todas las cosas a Dios por no dejarme a pesar de todo.

Agradecimiento

Agradezco a todos mis asesores que me ayudaron con sus correcciones y sugerencias, al posgrado, a CONACYT y a todas las personas que hicieron posible este trabajo.

Índice

Página

Tabla de contenido	
Dedicatorias.....	VII
Agradecimiento.....	VIII
Índice.....	IX
Lista de Tablas y Gráficos.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XII
Lista de definiciones.....	XIII
Resumen.....	1
Antecedentes:.....	2
Justificación.....	15
Hipótesis.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	16
Material y Métodos.....	17
Consideraciones Éticas.....	26
Discusión.....	33
Conclusión:.....	34
Bibliografía.....	35
Anexos.....	38

Lista de Tablas y Gráficos

	Contenido	Pagina
Tabla 1.	Variables	p. 18
Tabla 2.	Concentraciones de <i>Acca sellowiana</i> , Oral B, Consepsis y Colgate	p. 20
Tabla 3.	Muestras bacterianas usadas en el estudio	p.20
Tabla 4.	Diluciones de cada extracto a evaluar	p. 25
Tabla 5.	Análisis estadístico ANOVA.	p. 27
Gráfico 1.	MIC de extracto <i>Acca sellowiana</i>	p.29
Gráfico 2.	MIC de Colutorio Oral B	p. 30
Gráfico 3.	MIC de Concentrado Consepsis	p. 31
Gráfico 4.	MIC de Colutorio Colgate	p.32

Lista de Figuras

Figura.	Contenido.	Página.
Figura 1	Agar con <i>E. faecalis</i> .	p. 21
Figura 2	Agar con <i>S. viridans</i> .	p. 21
Figura 3	Agar con <i>S. salivarius</i> .	p. 21
Figura 4	Agar con <i>S. mutans</i> .	p. 21
Figura 5	250 ml agua destilada para el BHI.	p. 21
Figura 6	Mezcla del agua y polvo para el BHI.	p. 21
Figura 7	Recipiente con BHI envuelto en aluminio para esterilizarse.	p. 22
Figura 8	Desinfección de la campana.	p. 22
Figura 9	Calienta asa de siembra.	p. 22
Figura 10	Recolección de bacterias con asa de siembra.	p. 22
Figura 11	Colocación de bacterias en tubos con BHI.	p. 22
Figura 12	Incubación de tubos 24 hrs a 37°C	p. 22
Figura 13	Preparación del extracto de <i>Acca sellowiana</i> .	p. 23
Figura 14	Mezcla mediante vortex.	p. 23
Figura 15	Pipeteo de 75 µg de BHI	p. 23
Figura 16	Pipeteo del BHI en los pocillos	p. 23
Figura 17	Pipeteo de 154 µg de dilución	p. 23
Figura 18	Pipeteo de 75 µg de mezcla al siguiente pocillo	p. 23
Figura 19	Pipeteo de 25 µg de microorganismos	p. 24
Figura 20	Almacenaje de microplacas	p.24
Figura 21	Preparación de microplacas	p.25

Lista de abreviaturas

μg

μl

ml

MIC

Microgramos

Micro litros

Mililitros

Concentración Mínima Inhibitoria

Lista de definiciones.

Concentración Mínima Inhibitoria:	Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación
Antiséptico:	Sustancias que, aplicadas de forma tópica, sobre los tejidos vivos, tienen la capacidad de destruir los microorganismos o de inhibir su reproducción
Micro placas:	Es una placa con múltiples pocillos que se utilizan como pequeños tubos de ensayo
Espectrofotometría:	Técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución.
Extracto:	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.

Resumen.

Objetivo: Encontrar las concentraciones mínimas inhibitorias de antisépticos con gluconato de clorhexidina comerciales y extracto de guayaba brasileña (*Acca sellowiana*) en muestras de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans*. **Materiales y Métodos:** Estudio piloto experimental *in vitro* 4 grupos de bacterias probando 4 concentrados y realizando 3 réplicas por 5 concentraciones, control positivo y negativo de cada una, en muestras de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans*. Se hizo la siembra en micro placas y se leyó en un lector de micro placas. **Resultados:** Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en concentraciones de 33 y 16 microgramos, entre Colgate y Oral B con respecto a Consepsis, a concentración de 512 $\mu\text{g/ml}$, se mostró mejor efecto en Colgate, Oral B y *Acca sellowiana* en comparación a Consepsis. No se logró identificar una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de *Acca sellowiana*. **Conclusión:** Existieron diferencias respecto a las clorhexidinas la que mejor comportamiento tuvo fue la Colgate y Oral B en concentración 512 microgramos contra las demás y el extracto de *Acca Sellowiana*, en cuanto se compararon por concentración igualmente los que tuvieron diferencia significativa fueron las de Colgate y Oral B, sin embargo, la solución que menos MIC tuvo fue la de consepsis no obteniendo buenos resultados en comparación de los de los demás.

Antecedentes:

Introducción

El año de oro de los antibióticos fue con la producción de penicilina en 1941, descubierta por Fleming en 1928^{1,3}

Antibióticos

Es bien sabido que los antibióticos comenzaron como sustancias químicas producidas por ciertas especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y causan su destrucción, esto como mecanismo de defensa y supervivencia de ciertas especies. El término antibiótico se ha aplicado también a los compuestos sintéticos formulados en laboratorio. Los antibióticos se pueden clasificar de acuerdo a su efecto de acción, mecanismo de acción, espectro y estructura química.⁴

Según su efecto de acción los antibióticos se clasifican como: bacteriostáticos, si inhiben el crecimiento bacteriano; o bactericidas, si en cambio lisan y destruyen a las bacterias. Dependiendo de su mecanismo de acción o de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos pueden clasificarse en: inhibidores de la síntesis de la pared celular (penicilinas, cefalosporinas, betalactámicos, vancomicina, bacitracina, cicloserina, inhibidores de betalactamasa), agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la unidad 30s (aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas) y los que actúan sobre la subunidad 50s (macrólidos, lincosamidas y amfenicoles), agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos (quinolonas, rifamicinas y antivirales), agentes anti-metabólicos que antagonizan algunos pasos metabólicos en la síntesis del ácido fólico (sulfonamidas y trimetoprima) y los agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo (polimixina B, colistina, colistimetato, detergentes y antimicóticos poliénicos, como nistatina y anfotericina B).⁴

Otra clasificación un poco más utilizada es según su estructura química, y en base a esta clasificación los antibióticos pueden ser: betalactámicos (penicilinas naturales o sintéticas, carboxipenicilinas, isoxazolilpenicilinas, ureidopenicilinas, otras

penicilinas semisintéticas), cefalosporinas (primera, segunda, tercera, cuarta generación) o inhibidores de la betalactamasa (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam).⁴

Resistencia Bacteriana

Actualmente se sabe que un uso prolongado de terapias antibióticas puede llevar al desarrollo de resistencia por parte de microorganismos que inicialmente eran sensibles a los antibióticos, pero que luego pueden adaptarse gradualmente y desarrollar resistencia lo que provoca que las terapias antimicrobianas se vuelvan menos eficaces. Cuando un antibiótico ataca a una bacteria susceptible ésta morirá, pero esas que tienen insensibilidad continuarán reproduciéndose. El surgimiento de fenotipos resistentes a agentes antimicrobianos depende de varios factores del huésped: grado de expresión de la resistencia, capacidad de un microorganismo de tolerar mecanismos de resistencia, colonización inicial del sitio, y algunos otros factores. No es igual la rapidez con la que se dispersa la resistencia bacteriana, por ejemplo, se transfiere más rápida mente los genes de resistencia bacteriana si se encuentran en los plásmidos que si están en cromosomas.^{5,11} En una revisión sistemática y meta-análisis publicado en 2007 en el Journal of Antimicrobial Chemotherapy, se llegó a la conclusión de que la exposición prolongada a antibióticos aumenta el riesgo de encontrar *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.⁶

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos, como las mutaciones cromosómicas, pero usualmente se asocia con elementos móviles extra-cromosomales del ADN, como plásmidos, transposones, e integrones conseguidos de otras bacterias. La resistencia bacteriana puede ser intrínseca o innata; esto quiere decir; que es característica de una bacteria particular y depende en la biología del microorganismo. Por otra parte, la resistencia adquirida ocurre de: a) adquisición de genes exógenos por plásmidos (conjugación o transformación), transposones (conjugación), integrones y bacteriófagos (transducción), b) mutación de genes celulares, y c) una combinación de estos mecanismos.^{5,7}

Los mecanismos de resistencia bacteriana se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad. La inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas. Las enzimas que destruyen la estructura química de los betalactámicos son conocidas como beta-lactamasas, estas enzimas se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida, así mismo tenemos a otra enzima conocida como la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Otras enzimas que podemos mencionar son: cloranfenicol aciltransferasa, enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas).¹¹

Otro de los mecanismos de resistencia previamente mencionados es la alteración del sitio blanco del antibiótico, éste consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana, por ejemplo, la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, por mencionar algunas. Otro ejemplo a destacar es la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofrecen resistencia bacteriana a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* frente a las quinolonas.¹¹

Cuando la alteración se da en las barreras de permeabilidad se debe a cambios en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de flujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana. Una importante diferencia que existe entre ciertas bacterias es, por ejemplo, la membrana celular de las bacterias Gram negativas, la cual contiene un alto contenido de lípidos con respecto a las Gram positivas,

presentan una membrana externa con un 40% de lipopolisacárido lo cual le proporciona una barrera efectiva.^{5, 11}

Otro mecanismo es la Bomba de eflujo que se encuentra en la membrana celular y ésta lleva a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos, estas bombas se encuentran tanto en Gram negativos como en Gram positivos. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas trans membranales, sin embargo, debemos destacar que en las bacterias Gram negativas también involucra componentes de la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que portan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula, este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, beta lactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario utilizado para la limpieza de superficies.¹¹

Muchas mutaciones bacterianas implicadas en mecanismos de resistencia se presentan durante la división celular, sin embargo, también pueden surgir en células no divisibles o de lenta división.⁵

Sin embargo, desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de éste en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM),³ por lo tanto, una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles. En cuanto a los conceptos de sensibilidad y resistencia, éstos son absolutamente relativos y dependen tanto del valor de la localización de la infección como de la dosis y vías de administración del antibiótico.³

Debemos recordar que existen múltiples bacterias en el medio bucal en las cuales las bacterias llegan a ser resistentes por consiguiente se han llegado a usar diferentes alternativas como antisépticos orales, nuevos antibióticos o la búsqueda de nuevas sustancias como extractos (flavonoides, árboles frutales fenólicos entre otros) para observar su actividad antimicrobiana en México ⁸.

Relación entre el ser humano y los microorganismos

Desde el mismo momento del nacimiento, el ser humano queda colonizado por una enorme cantidad de microorganismos que se agrupan creando una flora microbiana indígena, el resultado es un supra organismo en el que los simbioses microbianos son 10 veces más abundantes que las propias células del organismo. Una de las principales funciones de la flora microbiana del ser humano es facilitar la adquisición de nutrientes y la extracción de energía a partir de los alimentos, estimula la diferenciación terminal (posnatal) de la estructura y la función de las mucosas y potencia los sistemas inmunitarios tanto innato como adaptativo, también ofrece una resistencia a la colonización frente a la invasión por patógenos, regula el metabolismo intermediario, procesa sustancias químicas ingeridas y proporciona cantidades pequeñas de factores de crecimiento accesorios para el ser humano.⁹ Incluso se ha observado una correlación entre los partos por cesárea y el desarrollo de problemas cognitivos y diversas enfermedades en el neonato según un meta análisis realizado por Zhang y colaboradores en 2019.¹⁰ Esto se debe al papel tan importante que cumplen las bacterias que colonizan al neonato y se cree que puede deberse a que el nacimiento por cesárea puede alterar el desarrollo inmunológico gracias a la perturbación de la colonización bacteriana normal irrumpiendo la actividad sensorial e inmune a través de la falta de respuesta al estrés o bien modificando la regulación epigenética de la metilación del ADN.¹⁰

En relación a lo planteado anteriormente, debemos saber que la microbiota humana puede definirse como el conjunto de microorganismos (alrededor de 90.000 millones de bacterias, arqueobacterias, microeucariotas y virus) que residen en el cuerpo humano; el microbioma humano, por otro lado, consta de los genes y productos génicos (ARN, proteínas, metabolitos) producidos por comunidades microbianas residentes, cabe resaltar que cada hábitat corporal está compuesto de especies bacterianas características y otros taxones microbianos que se adaptan a cada localización del cuerpo. Las diferencias en cuanto a composición microbiana dan lugar a diferencias de capacidad metabólica y de función agregada del microbioma humano.¹¹

Microbioma Oral

Se demostró que en el Proyecto Microbioma Humano existe una gran especificidad de nicho en el microbioma oral, con observación de distintas comunidades a nivel de taxones y de patrones de portadores génicos.¹¹ Un dato asombroso que ayuda a dimensionar la preponderancia de las bacterias en el organismo humano son las metodologías de microarreglos pirosecuenciación precoz y cultivo que han logrado estimar la existencia de aproximadamente 700 filo tipos de microorganismos orales. Sin embargo, se estimó que las muestras conjuntas de placa dental de 98 adultos sanos englobaban 22 filos, con 3.621 y 6.888 filo tipos a nivel de especie en la saliva y la placa, respectivamente. Según el HMP se estimó que existen casi 70 géneros distintos en los tipos de muestras humanas, de los cuales los más abundantes en adultos sanos son: *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Rothia*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas* y *Treponema*, además del reino bacteriano, *Methanobrevibacter* spp. del reino *Archaea* también se identificó en el microbioma oral.^{11,12} Es de vital importancia destacar que la microbiota que se asocia a las infecciones odontogénicas es compleja y suele reflejar la microflora oral indígena. Estas infecciones son polimicrobianas y su invasividad suele estar influenciada por las interacciones sinérgicas entre múltiples especies de microorganismos. A pesar de esta complejidad, existen pruebas evidentes de la función etiológica de microorganismos específicos en diferentes infecciones odontogénicas.^{11,12} Algunos de los factores que parece que determinan estos patrones de la localización son las características de adherencia selectiva de ciertas bacterias por varios tipos de células; las condiciones del entorno local, como la tensión de oxígeno, el potencial de óxido reducción (Eh) y el pH; la coagregación inter bacteriana, y la inhibición microbiana. Estos microorganismos muy organizados están dentro de una matriz extracelular formada principalmente por polisacáridos y existen en un entorno relativamente protegido. En condiciones «sanitarias» normales estas bacterias comensales mantienen una barrera inflamatoria no destructiva y eficaz contra posibles patógenos. Sin embargo, en condiciones patológicas esta homeostasis

microbiana se altera, y la microbiota comensal se cambia por una forma patogénica, que produce inflamación y destrucción tisular¹².

A continuación, haremos mención de las bacterias que se estudiarán o se pondrán a prueba y sus características y relevancia clínicas:

Streptococcus viridans:

Al principio solían clasificarse los estreptococos según los patrones de hemólisis que dejaban en las placas de agar sangre y podían ser beta-hemólisis (lisis completa), alfa-hemólisis (lisis parcial) o gamma-hemólisis (no hemolíticos). Históricamente los estreptococos orales fueron llamados *Streptococcus viridans* por el color verde que dejaban alrededor de las colonias debido a su hemólisis parcial.^{13,14} Son aerobios con capacidad para desarrollarse en condiciones anaerobias, no tienen catalasa y logran tolerar bien el oxígeno gracias a las peroxidasa flavinicas y pseudocatalasas; su crecimiento al aire se favorece por la presencia de un 5 a 10% de CO₂ en la atmosfera.¹⁵ Los *Streptococcus viridans* tienen características comunes como ser leucino amino péptido positivos, pirrolidónilamidasa negativos y no crecer en hipoclorito al 6.5%.¹⁶ Es importante recordar que los *Streptococcus viridans* son los colonizadores más numerosos en una cavidad oral sana, están implicados en la formación de la caries dental y son patogénicos cuando se introducen en distintos planos anatómicos de cabeza y cuello formando abscesos.¹⁴

Streptococcus salivarius:

Uno de los primeros colonizadores de la cavidad oral en el inicio de la vida del ser humano es el *Streptococcus salivarius*^{13,14} el cual es una bacteria comensal de la flora oral y del tracto digestivo en los adultos sanos. Las bacterias viven e interactúan simbióticamente entre ellas y el hospedero ayudando a mantener un equilibrio biológico, y el caso de *S. salivarius* no es la excepción. Un factor de virulencia clave es la adhesión, este proceso incluye la unión de la bacteria a las células del hospedero, a componentes de la matriz extracelular, así como a

bacterias del mismo tipo (auto agregación) o genéticamente distantes (co-agregación). Existen diversos lugares a los que se puede adherir el *S. salivarius* como son: superficies de cavidad oral, faringe, bronquios, algunas líneas epiteliales cervico-vaginales, se puede auto agregar a otros *S. salivarius*, a otros microorganismos.¹⁴

Es importante mencionar la habilidad que poseen los *Streptococos* para asimilar una gran cantidad de carbohidratos a través de la glicólisis, así como su tolerancia a un pH ácido. En condiciones de exceso de carbohidratos y condiciones limitadas de oxígeno el *Streptococcus* tiende a llevar a cabo la fermentación homoláctica reduciendo el piruvato en ácido láctico y generando así NAD del NADH.¹³

Enterococcus faecalis:

Los *Enterococos* son bacterias Gram positivas las cuales se han encontrado en el suelo, aguas marinas y superficiales, asociadas a plantas; en la fermentación de comida; como parte de la microbiota de vertebrados e invertebrados y como causantes de enfermedades en los seres humanos. Los *Enterococos* son bacterias no formadoras de esporas que pueden encontrarse individualmente, en par, cadenas o grupos. Son anaerobios facultativos con un metabolismo homofermentativo, con el ácido láctico como producto final principal de la fermentación de carbohidratos. En humanos es una de las dos especies de *Enterococcus* más comunes, habitan comúnmente en la flora intestinal, tracto urinario;¹⁶ participan en infecciones del torrente sanguíneo, abdomen, endocardio, tracto biliar, quemaduras¹⁷ y también está implicado en infecciones del sistema de conductos radiculares.^{17,18,19} *E. faecalis* posee habilidades muy importantes que como patógeno lo hacen capaz de evadir al sistema inmune, algunas como; adherirse a las células del hospedero, su matriz extracelular, y su capacidad de adherencia a materiales inertes, así como la capacidad de formar biofilm que lo hacen más resistente a los antibióticos y a la fagocitosis.²⁰

En su superficie contiene componentes bacterianos como los identificadores de moléculas adhesivas de la matriz, que son elementos en su superficie capaces de ayudarlo a adherirse en las superficies de los tejidos del hospedero. Una de estas proteínas es la proteína Ace que es una proteína que se une al colágeno; otro factor

de virulencia importante en la capacidad adherente son los pili que funcionan como adhesinas. La citolisina o hemolisina es otro factor de virulencia; ésta es una proteína lítica formada por dos péptidos que daña las células del hospedador y promueve la infección, también posee actividad bactericida dañando a otros organismos Gram positivos. Las proteínas de agregación que se inducen en la superficie, que juegan un papel doble en la virulencia, están involucradas en la formación de vegetaciones en la endocarditis infecciosa, en la adherencia a la matriz extracelular, la protección contra la fagocitosis, y potencializa el efecto patógeno de la citolisina. La gelatinasa es una metaloproteinasa de la matriz que hidroliza gelatina, colágeno, y otras proteínas, también inhibe la respuesta mediada por el complemento. La proteína de superficie asociada a su pared celular contribuye a la adhesión celular jugando un papel en la colonización en la uretra, endocarditis y promoviendo la formación de biofilm.²⁰

Gracias a su beta lactamasa, *E. faecalis* es resistente casi todas las cefalosporinas (probablemente con excepción de la ceftarolina y el ceftobiprol), penicilinas antiestafilocócicas y aztreonam. Es susceptible *in vitro* a vancomicina, pero resistente a clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos. Nuevos antibióticos como linezolid, tedizolid, daptomicina, telavancina y oritavancina son agentes activos contra enterococos.²⁰

Streptococcus mutans

Existen estudios en los que se muestra una correlación positiva entre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* con la prevalencia de caries. Por otra parte, hay proporciones elevadas de riesgo de desarrollar caries cuando se presentan estos microorganismos.²¹ Algunos estudios demuestran que *Streptococcus mutans* también se encuentran en proporciones elevadas en personas que presentan caries dental.^{21,22} Respecto de lo anterior es importante destacar que uno de los primeros factores de virulencia propios del *Streptococcus mutans* que se identificaron fue la capacidad de este microorganismo para colonizar superficies lisas en presencia de

sucrosa; este microorganismo en particular muestra una mejora en la colonización con el despliegue de este disacárido, así mismo, es capaz de sintetizar glucanos de la sucrosa que promueven la colonización. Estos microorganismos presentan la capacidad de agregación al crecer en presencia de la molécula mencionada. Se presume que el *S. mutans* posee la habilidad de unirse a la película en los dientes debido a moléculas de adhesión celular que contiene la bacteria, parece ser que algunas cepas de *mutans* se unen tanto por mecanismos de adhesión como por mecanismos mediados por glucanos. Ya previamente ha sido estudiado que éste microorganismo es capaz de fermentar una gran variedad de azúcares siendo de especial interés su capacidad de metabolizar sucrosa en ácido láctico más rápido que otras bacterias en la cavidad oral. Las cepas de *S. mutans* son más tolerantes al ácido que otras bacterias (a excepción de *Lactobacillus*), esta propiedad parece estar relacionada en parte a la relativa estabilidad ante los ácidos por parte de la bomba de hidrógeno asociada a su membrana.²³ Estas propiedades patogénicas de adhesión de la bacteria están relacionadas al descubrimiento de estructuras filamentosas largas similares a los pilis observados en superficies bacterianas. Dichas estructuras presentan propiedades adhesivas y pueden jugar un papel importante en la adhesión a las células y tejidos del hospedador, así como para la formación de biofilms.²³

Clorhexidina:

Esta bis guanidina es uno de los antisépticos más usados para la desinfección de piel y mucosas, es altamente utilizado en odontología como enjuague e irrigante, así mismo es muy útil en el control de la gingivitis y la periodontitis, así como en la prevención de caries dental, descontaminación oro faríngea y en el tratamiento endodóntico. Todas estas importantes utilidades son gracias a su actividad antibacteriana contra microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos, levaduras y virus.²⁴ Cabe mencionar de igual manera, que la clorhexidina es una bis guanidina catiónica con amplio efecto antimicrobiano, baja toxicidad en mamíferos y una fuerte

afinidad por la piel y mucosas.²⁵ La molécula de clorhexidina está compuesta por dos estructuras simétricas con 4 anillos cloro fenilos y 2 grupos de bis guanidinas unidos a un puente de Hexa metileno, debemos mencionar que la clorhexidina es una molécula catiónica cuya actividad biológica se debe a los átomos de cloro en ambos anillos fenólicos. La fórmula química del gluconato de clorhexidina es $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$.²⁴ Su efecto antimicrobiano se da porque la célula bacteriana característicamente está cargada negativamente, la molécula catiónica de la clorhexidina es atraída rápidamente a la superficie cargada negativamente de la bacteria con adsorción específica a componentes fosfatados. Esto altera la integridad de la membrana celular de la bacteria y la clorhexidina es atraída hacia la parte interna de la membrana bacteriana, la clorhexidina se une a los fosfolípidos del interior de la membrana permitiendo el aumento en la permeabilidad del interior de la membrana y provocando la fuga de componentes de bajo peso molecular como iones potasio. Hasta este punto los efectos en la bacteria son reversibles lo cual implica que los efectos bacteriostáticos o bactericidas están dados por la concentración del gluconato de clorhexidina.^{24,25,26}

Propiedades de los Extractos Herbales:

Existe un amplio y vasto número de sustancias activas en los extractos herbales que son responsables de su actividad y diversas propiedades medicinales dentro de los cuales podemos encontrar: alcaloides, componentes organosulfurados, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenos, cumarina, terpenos, taninos y metabolitos primarios (amino ácidos, péptidos, ácidos orgánicos). Algunos de estos compuestos exhiben propiedades antimicrobianas.^{8,27,28,29} Entre estos compuestos, los flavonoides son el grupo más prometedor de sustancias bioactivas en el ámbito de las propiedades antimicrobianas y al parecer con bajo toxicidad sistémica.^{8,28,29} A esta clase pertenecen productos secundarios del metabolismo comúnmente encontrados en varias frutas, vegetales y plantas medicinales mostrando propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por otro lado, los polifenoles encontrados como los flavonoides y los ácidos fenólicos exhiben una gran variedad de beneficios de los cuáles podemos destacar: efecto neuroprotector,

anticancerígeno, inmunomodulador, antidiabético, y antiadipogénico. Recientemente se ha mostrado que estos fitoquímicos exhiben también propiedades prebióticas y antimicrobianas contra patógenos intestinales.²⁹ Además de los flavonoides algunos ácidos orgánicos como: ácidos alifáticos, ácidos aromáticos y sobre todo los ácidos fenólicos son compuestos bioactivos de importancia en las plantas medicinales.²⁹

Propiedades químicas y biológicas de *Acca sellowiana* (guayaba brasileña):

Acca sellowiana es una especie nativa del sur de Brasil, se encuentra también en lugares como el norte de Paraguay, norte de Uruguay y Argentina. Esta planta ha tomado relevancia ya que en la última década se han estudiado varias propiedades biológicas como efectos antioxidantes, antibacterianos y antiinflamatorios; propiedades que podrían ser atribuidos a la presencia de componentes bioactivos como polifenoles y vitamina C.²⁷

En cuanto a los carbohidratos, los azúcares simples parecen predominar en su composición aunque se necesitan más estudios al respecto para lograr determinarlo con certeza. Se han encontrado un rango de diferentes y diversos polifenoles en distintas partes de la guayaba incluyendo la fruta, la cáscara, hojas, flor y las ramas. En la fruta que es la parte más utilizada se pueden encontrar diferentes polifenoles como quercetina, catequina, ácido elágico, rutina, ácido gálico, ácido siríngico, eriodictiol, pirocatecol y la eriocitrina.²⁷

Así mismo podemos encontrar también compuestos volátiles, aceites esenciales y lípidos; la mayoría de los compuestos volátiles a destacar en la fruta son: metil benzoato (39.2%), etil butanoato (8.5%), trans β -ocimeno (4.7%), etil hexanoato (1.2%) y heptano-1 (0.8%).²⁷ El metil benzoato y el etil benzoato son aproximadamente el 90% del total de aceites volátiles. Por otro lado, los principales componentes del aceite esencial de *Acca sellowiana* son: β -cariofileno, ledene, α -humuleno, β -elemene y δ cadinene.³⁰

Actividad biológica de *Acca sellowiana*:

Actividad antioxidante: Los estudios *in vitro* de la actividad antioxidante de la planta se basaron en 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), ABTS, y en los radicales libres

hidroxilos (OH), especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), iones férricos y muescas en el DNA.^{27,30} Las propiedades antioxidantes de la fruta del guayabo se pueden atribuir a compuestos bioactivos como los polifenoles y la vitamina C.

Actividad antimicrobiana: el extracto acetónico de la fruta del guayabo posee propiedades antimicrobianas, se identificó que la flavona es el mayor compuesto antimicrobiano en el extracto e inhibe a *Helicobacter pylori* y a *Rhyoctonia solani*, cabe mencionar también que la concentración mínima inhibitoria del extracto se midió contra diferentes bacterias y hongos encontrando que está entre 0.4 a 1.6 mg/ml y de 3.2 a 6.3 mg/ml, respectivamente.²⁷

Planteamiento del problema

Actualmente existe una fuerte problemática respecto a la resistencia bacteriana frente a muchas sustancias antimicrobianas y antisépticas, además de que también se ha vuelto una problemática a nivel mundial del uso indiscriminado, generándose una importante necesidad en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan tener efectividad contra estos microorganismos.

Justificación

Por consiguiente es importante el 1.- Crear nueva información para que el odontólogo pueda aplicar esta nueva sustancia a la práctica clínica cotidiana. 2.- Posiblemente usarla en un futuro para colutorios o medicamentos ya sea con aplicación local o sistémica y de esta manera ayudar a combatir la actual resistencia bacteriana, 3.- Observar el comportamiento de las clorhexidinas en el caso de ser diluidas. 3.- Crear nuevas líneas de investigación e innovación en diferentes sustancias que actúen frente a bacterias orales. 4.- Impacto de investigación en México ya que hay poca literatura en cuanto al uso comercial de las clorexidinas y el uso de *Acca-sellowiana*.

Hipótesis

- Hipótesis alterna
 - Existe diferencia en la concentración mínima inhibitoria de *Acca sellowiana* y de las clorhexidinas comerciales ante *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans*.

- Hipótesis Nula
 - No existe diferencia en concentración mínima inhibitoria de *Acca sellowiana* y de clorhexidinas comerciales ante *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans*.

Objetivo General

Identificar MIC de $\mu\text{g/ml}$ de *Acca sellowiana* y de clorhexidinas comerciales en bacterias Gram positivas.

Objetivos Específicos

1. Cuantificar por medio de espectrofotometría en micro placas con 72 μl de caldo con BHI y muestras de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans* en BHI (25 μl) y 75 μl de extracto de *Acca sellowiana* y controles de enjugues de clorhexidina y agua destilada, dilución a 186 μl . se deja en incubadora para crecimiento de 24 horas.
2. Comparar la frecuencia en los grupos de estudio del extracto.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria mediante la incubación de los microorganismos en 96 pocillos con una micro dilución de 200 μl de extracto de *Acca sellowiana* y enjugues de clorhexidina.

Material y Métodos

Diseño del estudio: piloto experimental *in vitro*.

n= 4 grupos de bacterias probando 4 concentrados y realizando 3 réplicas por 5 concentraciones, control positivo y negativo de cada una.

Muestreo: Se obtuvieron muestras de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus viridans* donadas del laboratorio de la Maestría en Endodoncia de la Facultad de Estomatología de la UASLP de la Dra. Ana María González Amaro.

Lugar: Laboratorios de la Maestría de Ciencias Odontológicas en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Laboratorios del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA)-IPICYT.

Variables a Estudiar.

Tabla 1. Descripción de las variables.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Metodológicamente.
Concentración Mínima Inhibitoria	Concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación	Se midió por espectrofotometría con un lector de microplacas	Nominal	Dependiente
Extracto	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.	Se midió en $\mu\text{g/ml}$ con una micro pipeta.	Continua	Independiente
Bacteria	Microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).	Medición de la densidad óptica a 600nm	Nominal	Independiente
Clorhexidina	Sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida.	Se midió en $\mu\text{g/ml}$ con una micro pipeta.	Continua	Independiente

Métodos

Se partió de 4 muestras de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mutans*. Las muestras se almacenaron en congelación a -20° C hasta llevar a cabo las diversas pruebas; posteriormente se cultivaron 100 micro litros de éstas en 5 mililitros de caldo BHI (brain heart infusión (BHITM, DIFCO Laboratorios, Detroit, MI, USA) por 24hrs a 37°C antes del estudio.

Se guardó un stock de cada bacteria en BHI con glicerol y se estimulaba su crecimiento cada vez que se descongelaban para poder hacer el procedimiento de las réplicas de microplacas El extracto metanólico de *Acca sellowiana* fue facilitado por la Dra. Alethia Muñiz Ramírez, del laboratorio de química de productos naturales del consorcio de investigación de innovación y desarrollo para las zonas áridas. Se diluyó 2000 microgramos de extracto metanólico de *Acca sellowiana* en 1ml de agua destilada y las clorhexidinas se diluyeron 1200 microgramos por mililitro de agua destilada, la MIC (Concentración Mínima Inhibitoria)^{MIC} se determinó mediante la colocación de 154 microlitros de stock de dilución (extracto de *Acca sellowiana* y concentrados comerciales de gluconato de clorhexidina), diluyendo éstos progresivamente a la mitad, se diluyó en proporción 1:1 en un medio de infusión brain heart infusión (BHITM, DIFCO Laboratorios, Detroit, MI, USA) conteniendo 2% de sucrosa y posteriormente colocándoles a cada pocillo 25 micro litros del stock bacteriano (con muestras de *S. mutans*, *S. salivarius*, *E. faecalis* y *S. viridans*), posteriormente se incubaron los 96 pocillos a 37°C por 24hrs. El análisis de espectrofotometría se realizó en un lector de micro placas (Lector de microplacas Biotek) a 600 nanómetros.

La siguiente tabla describe las concentraciones de los extractos evaluados: guayaba brasileña (*Acca sellowiana*), enjuague de clorhexidina 1 (Oral B Gingivitis, Procter & Gamble, gluconato de clorhexidina al 0.12%), Concentrado de Clorhexidina (Consepsis ultradent, gluconato de clorhexidina 2%) y Enjuague de clorhexidina 2 (Colgate Periogard, gluconato de clorhexidina al 0.12%) que se utilizaron en las micro placas para identificar la MIC de cada substancia.

Tabla 2. Concentraciones de: *Acca sellowiana*, enjuague Oral B, concentrado Consepsis y enjuague Colgate.

Medicamento y Porción	Referencia
<i>Acca sellowiana</i> 2000 µg/ml (154 µg/ml pocillo)	ND
Enjuague Clx 1 (Oral-B) 1200 µg/ml (154 µg/ml pocillo)	ND
Concentrado Clx (Consepsis)	ND
Enjuague Clx 2 (Colgate)	ND

Clx: clorhexidina, ND: sin referencia, µg/ml: microgramo por mililitro.

Tabla 3. Diluciones de cada extracto a evaluar con su control positivo y negativo respectivamente.

<i>Acca sellowiana</i>	Enjuague Clx 1 (Oral B)	Concentrado Clx (Consepsis)	Enjuague Clx 2 (Colgate)
512 µg/ml	512 µg/ml	512 µg/ml	512 µg/ml
264 µg/ml	264 µg/ml	264 µg/ml	264 µg/ml
132 µg/ml	132 µg/ml	132 µg/ml	132 µg/ml
64 µg/ml	64 µg/ml	64 µg/ml	64 µg/ml
32 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml
16 µg/ml	16 µg/ml	16 µg/ml	16 µg/ml

Clx: clorhexidina, ND: sin referencia, µg /ml: microgramo por mililitro.



Fig 1. Placa de agar con *E. faecalis*



Fig. 2 Placa de agar con *S. viridans*



Fig.3 Placa de agar con *S. salivarius*



Fig 4. Placa de agar con *S. mutans*



Fig 5. Se realizó el BHI con 250ml de agua destilada



Fig 6. Se mezclan los 250ml de agua destilada con 9.25gr de BHI en polvo



Fig 7. Se mete a esterilizar en papel aluminio



Fig 8. Se limpia la campana con alcohol y se desinfecta con luz ultravioleta 15min



Fig 9. Se calienta al rojo vivo el asa de siembra.



Fig10. Se recolectan bacterias del agar con el asa



Fig 11. Se depositan las bacterias en un tubo de ensaye con BHI.



Fig 12. Se dejan incubar los tubos 24hrs a 37°C



Fig 13. Se pesan 2048 μ g de *Acca sellowiana*



Fig 14. Se vortexea para obtener una mezcla homogénea.



Fig. 15 Se pipetearon 75 μ l de BHI.



Fig 16. Se colocó BHI en los pocillos.



Fig 17. Se colocan 154 μ l de dilución.



Fig 18. Se pasan 75 μ l de mezcla al sig pocillo para ir diluyendo la concentración

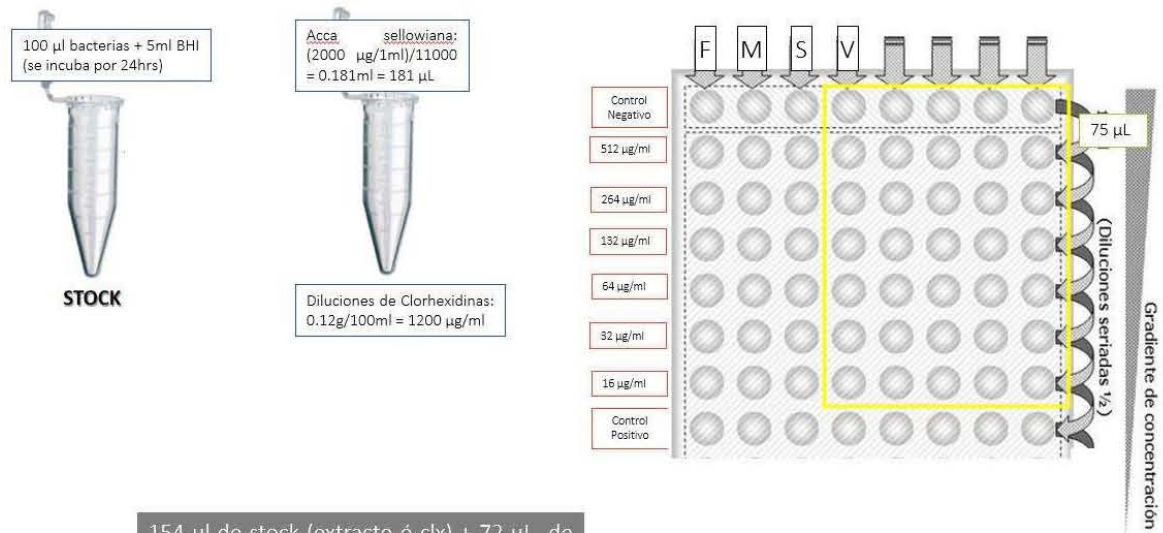


Fig 19. Se tomaron 25 μ l de bacterias



Fig 20. Se colocó la micro placa entre otras con agua para que no perdiera la humedad durante la incubación.

Figura 21. Preparación de microplacas.



154 µl de stock (extracto ó clx) + 72 µL de BHI - 75 µl del total (pasa al siguiente pozo) al final se colocan 25µl de bacterias.

Tabla 4. Muestras bacterianas utilizadas para el estudio.

no	bacteria	Procedencia
1	<i>E. faecalis</i>	Laboratorio Maestría en Endodoncia UASLP.
2	<i>S. mutans</i>	Laboratorio Maestría en Endodoncia UASLP.
3	<i>S. salivarius</i>	Laboratorio Maestría en Endodoncia UASLP.
4	<i>S. viridans</i>	Laboratorio Maestría en Endodoncia UASLP.

- Bacterias provenientes de un aislado clínico en el laboratorio de la Maestría de Endodoncia

Recolección de Datos

Se recolectaron los datos de las muestras de cada uno en 3 placas, se pasaron a una tabla en Excel las cuales se analizaron por medio de SigmaPlot 14.5 (Systat Software,UK e IBM SPSS Statistics Corp., Armonk, NY, USA)

Consideraciones Éticas

Se han tomado en cuenta el protocolo ético pertinente mandando el proyecto para su consideración al Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Estomatología, UASLP. El cuál fue asignado y aprobado con la clave: CEI-FE-029-021.El protocolo de experimentación del estudio tal como lo señala la revisión del 2013 del tratado de Helsinki de 1964 el cual en el apartado 23 contempla la revisión del protocolo experimental ante un comité de ética, así mismo como especifican los puntos 11 se tomaron las consideraciones pertinentes para minimizar el posible daño al ambiente y no aplicando los demás puntos del tratado por la inherente naturaleza *in vitro* del experimento, por lo cual, no siendo agraviados la salud ni integridad física, moral o psicológica de ningún individuo humano o animal no se encuentra conflicto en estos puntos, sin embargo al trabajar con cultivos microbiológicos se cuidó aplicar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que indica las regulaciones en el manejo de los Residuos-Peligrosos-Biológico-Infeciosos (RPBI) y las consideraciones éticas de Maestría en Ciencias Odontológicas de la UASLP se tomaron en cuenta los parámetros mencionados, ya que el estudio fue una prueba piloto *in vitro* como se mencionó anteriormente.

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de medidas de tendencia central y dispersión, pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe con pruebas uni variadas y bi variadas con un valor del 95% de confianza con una $p < 0.05$, y ANOVA con ajuste

de Bonferroni y Holm-Sidak (SigmaPlot 14.5 | Systat Software, Inc, IBM SPSS Statistics).

Resultados

Tabla 5. Promedios de Concentración Mínima Inhibitoria de Diferentes Extractos y Antisépticos.

		N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
ctrlneg	Colgate	4	0.52	0.13	0.46	0.69	0.29
	Consepsis	4	0.50	0.12	0.44	0.70	
	Oralb	4	0.63	0.12	0.45	0.72	
	GB	4	0.50	0.00	0.49	0.51	
sus512µg/ml	Colgate ^b	4	0.45	0.00	0.45	0.47	0.00
	Consepsis ^a	4	0.76	0.04	0.71	0.81	
	Oralb ^b	4	0.50	0.04	0.46	0.56	
sus264µg/ml	GB ^b	4	0.49	0.01	0.48	0.51	0.17
	Colgate	4	0.47	0.04	0.45	0.55	
	Consepsis	4	0.57	0.01	0.56	0.60	
	Oralb	4	0.56	0.13	0.49	0.76	
sus132µg/ml	GB	4	0.48	0.00	0.47	0.49	0.73
	Colgate	4	0.54	0.18	0.44	0.82	
	Consepsis	4	0.50	0.01	0.49	0.53	
	Oralb	4	0.59	0.21	0.48	0.92	
sus 66µg/ml	GB	4	0.49	0.00	0.49	0.50	0.23
	Colgate	4	0.64	0.20	0.50	0.93	
	Consepsis	4	0.46	0.06	0.42	0.56	
	Oralb	4	0.63	0.20	0.50	0.94	
sus33µg/ml	GB	4	0.48	0.00	0.48	0.49	0.05
	Colgate ^a	4	0.64	0.20	0.50	0.94	
	Consepsis ^b	4	0.40	0.02	0.38	0.43	
	Oralb ^a	4	0.70	0.24	0.50	1.05	
16.µg/ml	GB	4	0.46	0.00	0.46	0.47	0.04
	Colgate ^b	4	0.67	0.25	0.47	1.03	
	Consepsis ^a	4	0.41	0.09	0.35	0.56	
	Oralb ^b	4	0.80	0.23	0.67	1.16	
ctrl positivo	GB ^a	4	0.49	0.00	0.49	0.50	0.33
	Colgate	4	0.74	0.29	0.52	1.16	
	Consepsis	4	0.74	0.19	0.53	1.00	
	Oralb	4	0.73	0.32	0.53	1.23	
	GB	4	0.47	0.01	0.46	0.49	

*Análisis estadístico llevado a cabo con la prueba de ANOVA con ajuste de Matew Homsideid.

**GB;Guayaba Brasileña

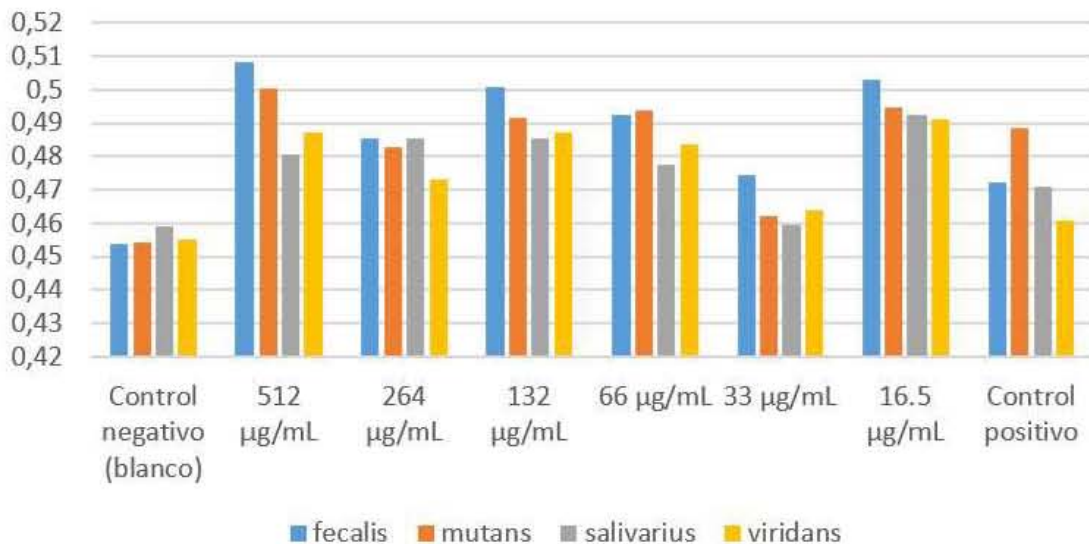
^{a,b,c} Las letras hacen referencia a que las concentraciones tienen efectos sobre las variables estudiadas cuando son diferentes las letras es que se encontró diferencia significativa, adiferencia de no tener es que las letras son iguales y si no se tiene es que no existió diferencia significativa.

La Tabla 5 En la cual podemos observar que se compararon las concentraciones de cada antiséptico y extracto de uno contra otro, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en concentraciones de 33 y 16 microgramos, entre Colgate y Oral B con respecto a Consepsis, así mismo en la concentración de 512 microgramos, se mostró mejor efecto en Colgate, Oral B y *Acca sellowiana* en comparación a Consepsis. No se logró identificar una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de *Acca sellowiana*. Observamos también, que existió un mejor comportamiento por parte de Colgate y Oral B.

El análisis estadístico nos muestra una diferencia estadísticamente significativa frente a las diferentes concentraciones de los concentrados evaluados frente al control positivo, sin embargo, no se encontró éste mismo resultado en el caso de *Acca sellowiana*.

Acca sellowiana:

Gráfico 1. Concentración Mínima Inhibitoria Extracto *Acca Sellowiana* por concentraciones



* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Descriptivamente la gráfica nos permite observar que se encontró una mayor inhibición a 33µg/ml en el extracto metanólico de *Acca sellowiana*, a pesar de esto no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre sus concentraciones,

Oral B:

Gráfico 2. Concentración Mínima Inhibitoria de Colutorio de Oral B. por concentraciones

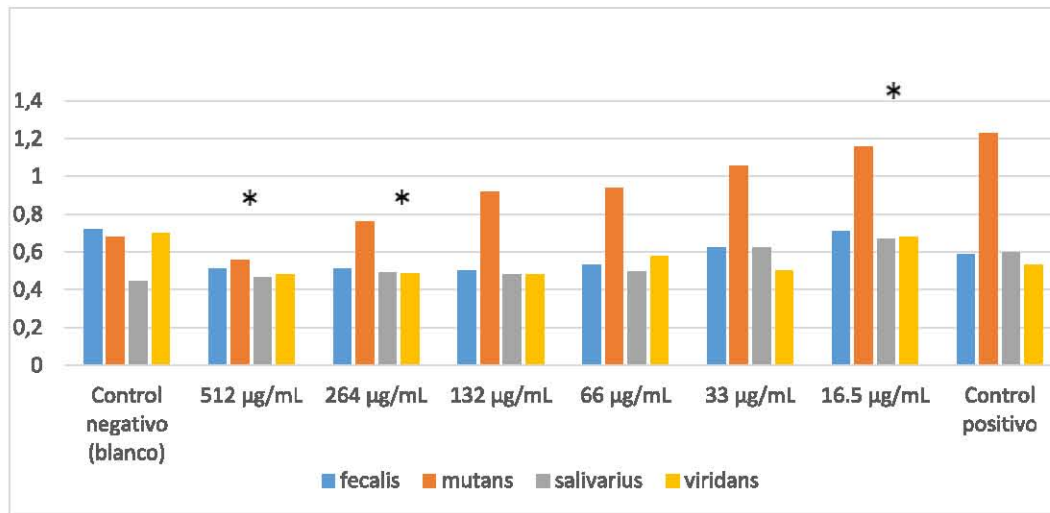


Gráfico 2. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Descriptivamente se observó que la concentración de 512 µg/ml de enjuague Oral B (0.12%) fue la más eficiente entre sus concentraciones, sin embargo, la bacteria *S. mutans* se observó que fue la que más crecimiento tuvo en las diferentes concentraciones, entre más aumentaban las concentraciones más disminuía su crecimiento, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) cuando se compararon sus concentraciones entre sí, a los de 512 µg y 264 µg contra 16.5 µg

Consepsis:

Gráfico 3. Concentración Mínima Inhibitoria de Consepsis por las concentraciones

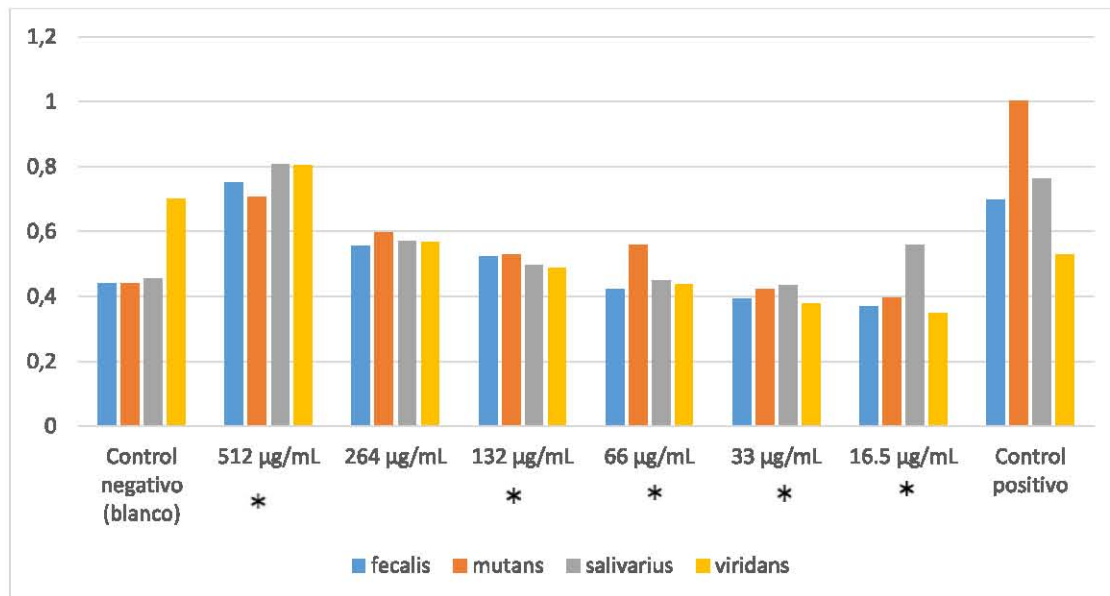
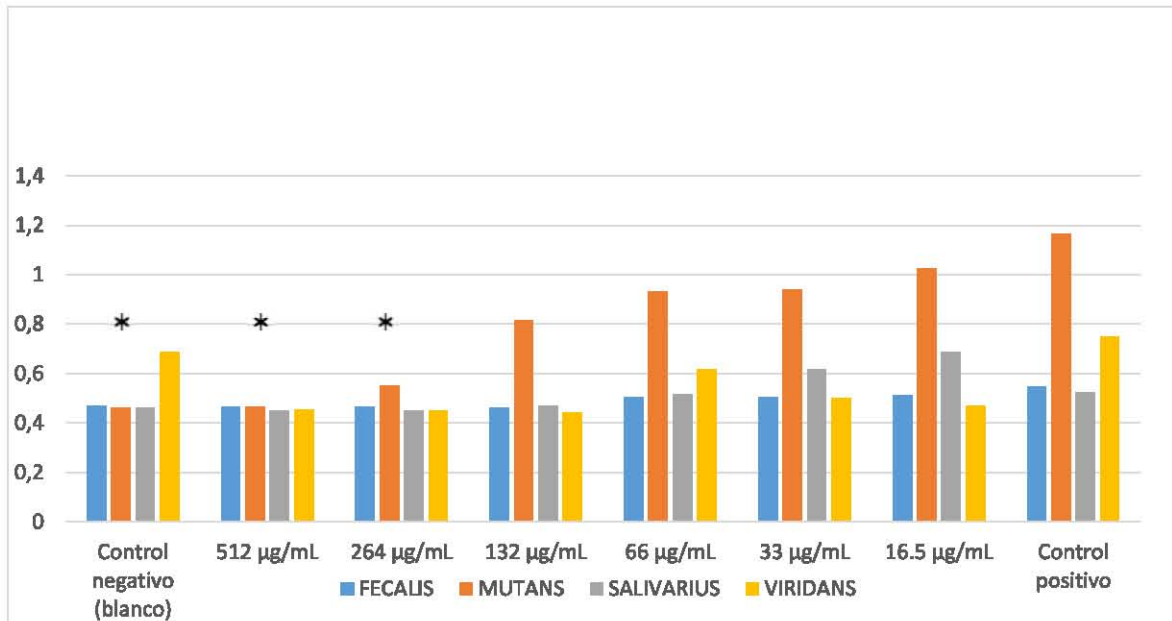


Gráfico 3. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) .

Se observó descriptivamente que la concentración de 33 µg /ml fue la que presentó un mejor efecto en contra de las bacterias estudiadas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de una concentración de 132 µg, 66 µg, 33 µg y 16.5 µg con respecto a las de 512 µg.

Colgate:

Gráfico 4. Medición de Densidad Óptica de Colgate por las concentraciones



Grafica 4. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Se observó descriptivamente que la concentración más efectiva en el caso del colutorio Colgate fue de 512 µg/ml, así mismo podemos observar que, conforme la concentración de la dilución va disminuyendo así mismo, el efecto contra *S. mutans* va disminuyendo progresivamente. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de 512 y 264 respecto al control negativo.

Discusión

Existe una gran relevancia de las enfermedades bucales en el mundo, en México se estima que aproximadamente el diagnóstico más frecuente es la caries dental 80% seguido por la enfermedad periodontal 10%,³¹⁽³⁷⁾ así mismo se han encontrado diversas bacterias resistentes a los antibióticos utilizados actualmente, bacterias tales como: *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa* por mencionar algunas,³²⁽³⁶⁾ por ello es importante lograr determinar nuevos compuestos activos y su respectiva concentración inhibitoria para lograr dar una aplicación clínica a los hallazgos. Nuestro estudio tiene diversas debilidades y limitantes como son; el ser un estudio piloto con una muestra pequeña, así mismo, algunas fortalezas a nuestro favor es el aporte en la investigación de nuevas sustancias antimicrobianas como *Acca sellowiana* de la cual, se encontraron pocos reportes al respecto. Se encontró poca literatura que evaluara los compuestos usados en nuestro estudio en las bacterias estudiadas por nosotros y utilizando la metodología de micro placas para la determinación de la MIC

En nuestro estudio encontramos que la concentración en la que se halló menor crecimiento bacteriano en las distintas presentaciones comerciales de clorhexidina fue: 512µg /ml para oral B y Colgate, observándose una menor eficacia en *S. mutans* con forme las concentraciones disminúan, por otro lado, en un estudio realizado por Yousefimanesh y colaboradores en 2015³³⁽³⁸⁾ determinaron que la concentración mínima inhibitoria de dos colutorios con clorhexidina ante *S. mutans* fue de 0.14µg /ml para el colutorio de clorhexidina al 0.12% y de 0.48µg /ml para el colutorio de clorhexidina al 0.2%, contra *S. salivarius* la MIC fue de 0.73µg/ml para el colutorio de clorhexidina al 0.12% y de 0.24µg/ml para el colutorio de Behsa (0.2%)³³⁽³⁸⁾ por otro lado nosotros obtuvimos una MIC del colutorio Oral B y Colgate con clorhexidina al 0.12% de 512µg /ml para el *S. mutans*, , no encontrándose una relación con nuestros resultados.

En nuestro estudio donde se evaluó el extracto de *Acca sellowiana* mostro inhibición a una concentración de 33µg/ml sin diferencia significativa sin embargo a diferencia de ,el autor Jitrada Wannachot y Sakulrat Rattanakiat (2015) reporta una especie similar (*P. guajava*,) contra clorhexidina observando una MIC para *P. guajava* en

combinación con *S. aromaticum* de 1560µg frente a *S. mutans*,³⁴⁽³⁹⁾ ya que ambos estudios se realizaron utilizando a *S. mutans* esto nos permite observar que existen diversos extractos que han sido probados en las bacterias de nuestro estudio y reportados en la literatura. Por otro lado, Masadeh y colaboradores (2013) compararon la mínima concentración inhibitoria de diversos colutorios de gluconato de clorhexidina, fluoruro de sodio, gluconato de clorhexidina, iodopovidona y eucalipto contra diversas bacterias, encontrando una CMI contra *E. faecalis* de 29.2 ± 19.09 , 41.7 ± 14.43 y 25.0 ± 0.00 para los colutorios de gluconato de clorhexidina al 0.2% evaluados³⁵, sin embargo nosotros obtuvimos una inhibición para esta bacteria en concentración de 16.5µg para Consepsis (clorhexidina al 0.2%).

Baena-Santillán y colaboradores en un estudio realizado en 2020 compararon la concentración mínima inhibitoria de extractos de *Hibiscus sabdariffa*, seis enjuagues comerciales y enjuague de clorhexidina al 0.12% en *S. mutans*, *C. gingivalis*, *S. sanguinis* y *S. aureus* encontrando una MIC para *S. mutans* con el colutorio de clorhexidina al 0.12% de 3000µg/ml siendo un resultado alejado del encontrado por nosotros al presentarse el mejor efecto de los colutorios Colgate y Oral B a 512 µg/ml.³⁶

Conclusión:

Nuestro estudio piloto nos abre un gran campo para nuevas líneas de investigación en el campo de los antisépticos y antibacterianos, nuestros resultados nos permiten observar que las clorhexidinas Colgate y Oral B en la concentración de 512µg/ml y 264µg/ml mostraron su mejor actividad, encontrándose su mejor efecto entre éstas concentraciones, por otro lado el concentrado Consepsis a 0.2% no obtuvo un resultado satisfactorio encontrándose una actividad superior de los colutorios Colgate y Oral B frente a Consepsis. No se logró encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de *Acca sellowiana* ni respecto a los demás concentrados. Por otro lado, se observó en el experimento que los compuestos de clorhexidina disminuyen su eficacia contra *S. mutans* a medida que la concentración disminuye.

Bibliografía

1. Liebana J. Microbiología Oral. 2da edición. Madrid: Mc Graw- Hill; 2002.p.345-64.
2. Perez, H, Robles, A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista Medica MD. 2013;4(3): 187 - 191.
3. Fernandez, F, Lopez, J, Ponce, L, Machado, C. RESISTENCIA BACTERIANA. Rev Cubana Med Milit. 2003;32(1): 44 - 48.
4. Cué, M. ANTIBACTERIANOS DE ACCIÓN SISTÉMICA PARTE I ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS. Rev Cubana Med Gen Integr. 1998;14(4): 347-361.
5. Giedraitienė , A, Et al. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. Medicina (Kaunas). 2011;47(3): 137 - 146.
6. Tacconelli, E, Et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007;61(1): 26-38.
7. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. BMJ 1998;317:657-60.
8. Lira-Saldivar, R.H., 2003. "Estado Actual del Conocimiento Sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [Larrea tridentata (D.C.) Coville]". Revista Mexicana de Fitopatología, 21: 214- 222.
9. Relman, D. Principios básicos en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. In: Bennett, J, Dolin, R, Blaser, M (eds.) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Barcelona, España: Published by arrangement with Elsevier Inc; 2016. p. 1-12.
10. Zhang, Tianyang; Sidorchuk, Anna; Sevilla-Cermeño, Laura; Vilaplana-Pérez, Alba; Chang, Zheng; Larsson, Henrik; Mataix-Cols, David; Fernández de la Cruz, Lorena (2019). Association of Cesarean Delivery With Risk of Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders in the Offspring. JAMA Network Open, 2(8):1-19
11. Aagaars, K. El microbioma humano de localizaciones corporales específicas y sus características biológicas únicas. In: Bennett, J, Dolin, R, Blaser, M (eds.) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Barcelona, España: Published by arrangement with Elsevier Inc; 2016. p. 13-21.
12. Chow, A. Infecciones de la cavidad oral, el cuello y la cabeza. In: Bennett, J, Dolin, R, Blaser, M (eds.) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Barcelona, España: Published by arrangement with Elsevier Inc; 2016. p. 816 - 833.
13. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. 2018. Biology of Oral Streptococci. Microbiol Spectrum 6(5):GPP3-0042-2018.
14. Couvigny B, Kulakauskas S, Pons N, Quinquis B, Abraham A-L, Meylheuc T, Delorme C, Renault P, Briandet R, Lapaque N and Guédon E (2018)

- Identification of New Factors Modulating Adhesion Abilities of the Pioneer Commensal Bacterium *Streptococcus salivarius*. Hupp, J.R. *Bacteriology of the Head and Neck Regions*. In: Hupp, J.R, Ferneini, E.M (eds.) *Head, Neck, and Orofacial Infections: An Interdisciplinary Approach*. St Louis, Missouri: Elsevier Science; 2016. p. 27-37.
15. Liebana, J. Genero *Streptococcus* y bacterias relacionadas. In: Liebana, J, Castillo, A, Rodriguez, C (eds.) *Microbiología Oral*. Canada: Mc Graw-Hill; 2002. p. 225-334.
 16. Facklam, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(4): 613-630.
 17. Love, R, Blomqvist, S, Almsta° hl, A, Carle´ n, A. Enterococcus faecalis – a mechanism for its role in endodontic failure. *Journal of Oral Microbiology*. 2001;34(1): 399-405.
 18. Nair, P, Blomqvist, S, Almsta° hl, A, Carle´ n, A. pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6): 348-381.
 19. García-solache, M. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(2): 1 - 28.
 20. Del pozo, J. Biofilm-related disease. *Expert Review of Antiinfective Therapy*. 2017;16(1): 1 - 15.
 21. Kuramitsu, H. Virulence Factors of Mutans Streptococci: Role of Molecular Genetics. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1993;4(2): 159 - 176.
 22. Kohler, B. the effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria streptococcus mutans and lactobacilli in their children. *Archs oral Biol*. 1984;29(11): 879-883.
 23. Krzyściak, W, Jurczak, A, Kościelniak, D, Bystrowska, B, Skalniak, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;33(4): 499 - 515.
 24. Karpinski, T.M, Et al. Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015;19(1): 1321-1326.
 25. Jones, C, Et al. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontology* 2000. 1997;15(1): 55-62.M
 26. Russell, A.D, Et al. Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection*. 1993;25(1): 229-238.
 27. Zhu, F. Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). *Trends in Food Science & Technology*. 2018;81(1): 121 - 131.
 28. Stege, P.W., Davicino, R.C., Vega, A.E., Casali, Y.A., Correa, S., Micalizzi, B., 2006. "Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*". *Phytomedicine*, Nov;13(9-10): 724-727.

29. Adamczak, A, Ożarowski, M, Karpiński, T. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(1): 1 - 16.
30. Mokhtari, Mona; Jackson, Michael; Brown, Alistair; Ackerley, David; Ritson, Nigel; Keyzers, Robert A; Munkacsi, Andrew (2018). Bioactivity-guided metabolite profiling of feijoa (*Acca sellowiana*) cultivars identifies 4-cyclopentene-1,3-dione as a potent antifungal inhibitor of chitin synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
31. Lira-rivera, A, Et al. Prevalencia de Enfermedades Bucales en 2016 - 2017 en la clínica de admisión de la Facultad de Odontología de la UATx. *Revista Mexicana de Medicina Forense (Rev Mex Med Forense)*. 2019;4(1): 64-66.
32. Basile, A, Et al. Antibacterial and Antifungal Properties of Acetonic Extract of Feijoa sellowiana Fruits and Its Effect on Helicobacter pylori Growth. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. 2010;13(1): 189-195.
33. Yousefimanesh, H, Et al. Prevalencia de Enfermedad Comparison of the Antibacterial Properties of Three Mouthwashes Containing Chlorhexidine Against Oral Microbial Plaques: An in vitro Study. *Bucal en 2016 - 2017 en la clínica de admisión de la Facultad de Odontología de la UATx. Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(2): 1-4.
34. Wannachot, J, Rattanakit, S. In Vitro Antibacterial Activity of Selected Herbal Extracts on Streptococcus mutans. *The International Conference on Herbal and Traditional Medicine*. 2015;1(1): 94-103.
35. Masadeh, M, Et al. Antimicrobial Activity of Common Mouthwash Solutions on Multidrug-Resistance Bacterial Biofilms. (*J Clin Med Res*). 2013;5(5): 389-394.
36. Baena-santillán, E, Et al. Comparison of the Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Calyx Extracts, Six Commercial Types of Mouthwashes, and Chlorhexidine on Oral Pathogenic Bacteria, and the Effect of Hibiscus sabdariffa Extracts and Chlorhexidine on Permeability of the Bacterial Membrane. *Journal of Medicinal Food*. 2020;00(0): 1-9.