

# EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE LA CÁSCARA, PULPA Y SEMILLA DE UVA (*VITIS VINIFERA*) SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS*, ESTUDIO IN VITRO

## ANTIMICROBIAL EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS FROM THE PEEL, PULP AND GRAPE SEED (*VITIS VINIFERA*) ON *STREPTOCOCCUS MUTANS*, IN VITRO STUDY

Josué Caicedo Salazar<sup>1a</sup>, Fernanda Mayorga Solórzano <sup>a</sup>, Víctor Montaña Tatés<sup>a</sup>, María Salazar Garcés<sup>1,2c,d</sup>, Ana del Carmen Armas <sup>1b,d</sup>.

### RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad antibacteriana de extractos acuosos de uva (*Vitis vinifera*) obtenidos desde la cascara, semilla y pulpa, sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 35668, Ecuador), empleando clorhexidina al 0.12% como control positivo y agua destilada como control negativo. **Materiales y métodos:** Se obtuvieron extractos acuosos a partir de la pulpa, semillas y cáscara de uva de la región norte del Ecuador, a una concentración de 40, 70 y 100%, que fueron impregnados 20 ml de cada uno en discos de papel filtro y colocados en cajas Petri con cepas de *Streptococcus mutans* inoculadas en agar sangre, discos impregnados en clorhexidina al 0,12% y agua destilada fueron empleados como control; la actividad antimicrobiana fue evaluada considerando los halos de inhibición obtenidos a las 24 y 48 horas de incubación. **Resultados:** los tiempos de evaluación 24 y 48 fueron diferentes ( $p= 0,00$ ) mostrándose mayor efecto inhibitorio a las 48 horas, donde el extracto de semilla de uva al 100% presentó actividad antimicrobiana similar a la clorhexidina al 0,12%, y la concentración al 70% del mismo extracto menor inhibición. Sin embargo, los extractos de cáscara y pulpa en su diferente concentración no presentaron halos de inhibición frente a *Streptococcus mutans*. **Conclusiones:** El extracto acuoso de semillas de uva al 100%, mostro actividad antimicrobiana similar a la clorhexidina al 0,12% frente al *Streptococcus mutans*.

**Palabras Clave:** Compuestos fenólicos, extractos vegetales, vitis, *Streptococcus mutans*. (Fuente: DeCS BIREME)

### ABSTRACT

**Objective:** To determine the antibacterial activity of aqueous grape extracts (*Vitis vinifera*) obtained from the skin, seed and pulp, on *Streptococcus mutans* (ATCC 35668, Ecuador), using 0.12% chlorhexidine as a positive control and distilled water as a negative control. **Materials and methods:** Aqueous extracts were obtained from the pulp, seeds and grape skin of the northern region of Ecuador, at a concentration of 40, 70 and 100%, which were impregnated 20 ml each in paper filter discs. and placed in Petri dishes with strains of *Streptococcus mutans* inoculated on blood agar, disks impregnated in 0.12% chlorhexidine and distilled water were used as control; the antimicrobial activity was evaluated considering the inhibition zones obtained at 24 and 48 hours of incubation. **Results:** The evaluation times 24 and 48 were different ( $p = 0.00$ ) showing a greater inhibitory effect at 48 hours, where the 100% grape seed extract presented antimicrobial activity similar to 0.12% chlorhexidine, and the 70% concentration of the same extract reduced inhibition. However, peel and pulp extracts in their different concentration did not present halos of inhibition against *Streptococcus mutans*. **Conclusions:** The aqueous extract of 100% grape seeds showed antimicrobial activity similar to 0.12% chlorhexidine against *Streptococcus mutans*.

**Keywords:** Phenolic compounds, plants extracts, *Streptococcus mutans*, vitis. (Source: MeSH NLM)

**Recibido:** 9 de abril 2018

**Aprobado:** 20 de junio 2018

**Publicado:** 30 de junio 2018

<sup>1</sup>Universidad Central del Ecuador

<sup>2</sup>Universidad Tecnológica Equinoccial del Ecuador

Este es un artículo Open Access distribuido bajo la licencia Creative Commons Atribucion- No Comercial-Compartir Igual 4.0

<sup>a</sup> Odontólogo, <sup>b</sup> PhD

<sup>c</sup> Master en ciencias Odontológicas, <sup>d</sup> Docente



### Correspondencia:

Josué Caicedo Salazar, Odontólogo,

Correo

electrónico: [josue\\_odeciac92@hotmail.com](mailto:josue_odeciac92@hotmail.com)

**Citar como:** Caicedo Salazar J, Mayorga Solórzano F, Montaña Tatés V, Salazar Garcés M, Armas A. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de la cáscara, pulpa y semilla de uva (*Vitis vinifera*) sobre *Streptococcus mutans*, estudio *in vitro*. KIRU. 2018 abr-jun; 15(2): 77-80. <https://doi.org/10.24265/kiru.2018.v15n2.03>

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es considerada como una de las enfermedades bucales más comunes en los seres humanos <sup>(1)</sup>, resultante de múltiples factores como una deficiente higiene oral, alto consumo de alimentos ricos en sacarosa <sup>(2)</sup> y la presencia de microorganismos <sup>(3)</sup> asociados a la producción de un polisacárido de dextrano, que al ser un elemento extraordinariamente adhesivo <sup>(4)</sup>, se fija a la superficie dental produciendo desequilibrio en los procesos de desmineralización y remineralización <sup>(5)</sup>, provocando pérdida de estructura dental, afectando así al bienestar y calidad de vida de las personas <sup>(6)</sup>.

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de micronutrientes presentes en el reino vegetal y forman junto con los polifenoles extraídos de diferentes plantas un elemento importante de la dieta humana <sup>(7)</sup> con actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas <sup>(8)</sup>, despertando creciente interés en el estudio de prevención de diferentes enfermedades antimicrobianas <sup>(9)</sup>.

La uva (*Vitis vinifera*) considerada una vava globosa, pequeña de pulpa muy jugosa, cáscara fuerte de color oscuro y semillas de color marrón claro <sup>(10)</sup>, presenta gran cantidad de compuestos polifenólicos con un efecto antimicrobiano y antioxidante disperso en su estructura <sup>(11)</sup>.

El triclosán y el gluconato de clorhexidina, constituyen sustancias con propiedades antibacterianas sobre la placa dental, con gran éxito en la terapéutica odontológica relacionado a la inhibición del *Streptococcus mutans* (*S mutans*) <sup>(10)</sup>; sin embargo su uso prolongado desencadena inconvenientes relacionados con la pigmentación dental y del dorso de la lengua, descamación de la mucosa bucal, sequedad bucal e inflamación ocasional y transitoria de la parótida y modificaciones gustativas asociadas <sup>(11,12)</sup>.

La gran variedad de plantas, semillas y frutos ancestralmente empleados como alternativa terapéutica en el Ecuador <sup>(13)</sup>, despiertan el interés de a través de este estudio determinar el efecto antibacteriano de extractos acuosos de uva obtenidos a partir de la cáscara, pulpa y semilla de este, sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 35668, Ecuador).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se plantea un estudio *in vitro* con 4,5 kilos de uvas provenientes de la región norte del Ecuador, las mismas fueron obtenidas en mercados locales tras un riguroso análisis visual. Se descartó aquellas con lesiones, ralladuras en su cascara o en condiciones inadecuadas para su consumo, las mismas fueron procesadas en el

laboratorio químico de la Universidad Central del Ecuador. Previamente lavadas con agua corriente y un agente de desinfección (Lider, Chile). La separación de la cáscara, pulpa y semillas se la hizo individual y manualmente almacenándolas herméticamente en bolsas (Ziploc, Colombia) a 10°C durante 24 horas. Seguidamente fueron sometidas a un secado en estufa (Binder, Alemania) a 40°C durante 72 horas.

Una vez separados los elementos de la uva se procedió a la obtención de su extracto acuoso por Soxhlet (USA) a 90°C durante tres horas y evaporación del agua a 38°C durante 72 horas. La sustancia obtenida se consideró como extracto al 100% y fue diluida con agua destilada para obtener el extracto a la concentración del 70 y 40%, las diferentes concentraciones fueron almacenadas en recipientes de vidrio color ámbar a 28°C de temperatura hasta su empleo.

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó una cepa liofilizada de *S mutans* (ATCC 35668, Ecuador) activada en 1 ml de caldo nutritivo TSB (tryptic soy broth), con el fin de enriquecer y rehidratar al microorganismo se utilizó cajas de agar sangre de cordero 5% (Cultiprep, Ecuador) las mismas contaban con asa estéril. El método de siembra fue por agotamiento y se verifico que las colonias no estuvieran contaminadas con una tinción de Gram. Las mismas fueron observadas al microscopio en campo de 100x. como resultado se evidenció cocos Gram positivos en pares o cadenas cortas característico de *S mutans*.

La prueba de sensibilidad, fue ejecutada una vez identificada ausencia de contaminación de las colonias, para lo cual se preparó un inóculo de turbidez 0.5 Mac Farlan, partiendo de las colonias que crecieron y fueron aisladas del agar sangre; en dicho inocuo se sembraron 15 placas en agar Müeller-Hinton, mediante la técnica de siembra en césped y con hisopo.

Los discos de papel filtro (Whatman <sup>TM</sup>, España) fueron impregnados con 20 µL de cada una de las concentraciones al 40, 70 y 100% de los extractos acuosos de cáscara, pulpa y semillas de uva. Como control positivo para sensibilidad se utilizó Clorhexidina al 0.12% (Lacer, España) y como control negativo se utilizó agua destilada 20µL. Se procedió a colocar con pinzas estériles y presionar sobre las cajas; las mismas fueron marcadas con la concentración y el extracto usado e incubadas a 37°C en una jarra de anaerobiosis GasPak Plus <sup>TM</sup>.

La evaluación de actividad de inhibición se realizó a las 24 y 48 horas de inhibición con una regla milimetrada, valorando el diámetro de los halos formados alrededor de los discos de filtro. Se consideró que mientras mayor sea la medida del halo la sustancia presenta mayor efectividad sobre la inhibición en el crecimiento de

cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 35668, Ecuador). Los valores fueron recolectados en tablas Excel y sometidos a análisis mediante el programa SPSS y pruebas estadísticas de Shapiro-Wilk y KruskalWallis.

## RESULTADOS

Los datos analizados mediante la prueba de Shapiro – Wilk demostraron que las muestras no provenían de una población normal, por lo que se decidió realizar pruebas no paramétricas mediante Kruskal Wallis. Con respecto a los dos tiempos de evaluación 24 y 48 horas, fue posible determinar una diferencia entre estos de ( $p < 0,05$ ), los mayores valores de inhibición fueron observados a las 48 horas.

Los valores que se obtuvieron de la inhibición con clorhexidina al 0,12% fueron considerados como referencia positiva y los valores obtenidos con los diferentes extractos fueron comparados con este. De igual manera se observó que el extracto de semillas de uva al 100%, presentó actividad inhibitoria similar a la clorhexidina al 0.12% a las 48 horas.

Al analizar la medida poblacional y considerando que los mayores valores de inhibición fueron conseguidos a las 48 horas, se evidenció una similitud entre el extracto de semilla de uva al 100% y Clorhexidina al 0,12% ( $p=1$ ), así como entre el extracto de semilla de uva al 40% y agua destilada. Con respecto a los componentes de la fruta evaluados, pulpa y cascara en las distintas concentraciones y tiempos de inhibición, los valores resultantes fueron menores y diferentes estadísticamente, a diferencia de, los conseguidos con la semilla al 100%.

## DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron un mayor poder inhibitorio sobre el *S mutans*, a las 48 horas, con similitud entre los extractos de semilla de uva al 100% y la clorhexidina al 0,12%, así como un bajo desempeño del extracto de semilla de uva al 40% comparable al agua destilada empleada como control negativo, resultados que pueden explicarse por los componentes polifenólicos<sup>(17)</sup>, y su capacidad antioxidante, incluyendo ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos presentes en la fruta<sup>(18)</sup>.

Si bien son muchos los factores interrelacionados con el proceso carioso, se debe resaltar que el *S mutans* constituye el principal microorganismo relacionado con este problema<sup>(3)</sup>.

En los países latinoamericanos pertenecientes al área andina como el Ecuador, se presentan una variedad de plantas, cuya estructura cuenta con diferentes aceites esenciales y polifenoles<sup>(19)</sup> que incitan a buscar a partir de extractos vegetales y fuentes naturales de fácil acceso, a elementos antioxidantes con propiedades

biológicas y antibacterianas<sup>(16)</sup>, sin efectos colaterales, que consigan actuar sobre cepas de microorganismos responsables de diferentes enfermedades<sup>(20)</sup>.

La uva se muestra como un fruto de uso frecuente y fácil obtención, sin embargo cuando se trata de obtener extractos a partir de ella, nos encontramos ante una gran variedad de técnicas<sup>(19)</sup>, lo cual dificulta la obtención de un resultado conclusivo<sup>(18)</sup>, la técnica de obtención de extracto empleada en este estudio si bien es aceptada, desencadena resultados que merecen ser probados ejecutando otras técnicas de obtención<sup>(20)</sup>, sin embargo, los resultados demostraron que los extractos de semilla al 100% cuentan con una actividad elevada que podría explicarse por la capacidad de antioxidantes relacionada al contenido de polifenoles totales<sup>(21)</sup>.

Una limitación que se debe considerar, es la falta de literatura existente y su relación con bacterias específicas a nivel bucal, específicamente con el *S mutans*, sin embargo, los resultados invitan a seguir investigando con las diversas variedades de uva existente y sobre todo aprovechar el uso de los residuos de esta fruta que generalmente son desechados<sup>(22)</sup>.

Desde el punto de vista clínico, la caries dental y la gingivitis constituyen las enfermedades muy frecuentes y considerar las propiedades y composición de las diferentes sustancias existentes en la flora ecuatoriana, siempre será una alternativa, considerando que puede ser en un futuro un elemento que reemplace formulas químicas desencadenantes de alteraciones muchas de ellas irreversibles.

Se concluye en base a la metodología empleada en este estudio *in vitro* y considerando la inhibición a las 48 horas, que el extracto acuoso de semillas de uva al 100%, muestra actividad antimicrobiana similar a la Clorhexidina al 0,12% frente al *Streptococcus mutans*.

## Agradecimientos

Agradecemos al Microbiólogo Andrés Soler Carvajal de la Universidad Industrial de Santander, por aportar información en el protocolo de laboratorio.

## Fuente de financiamiento:

Autofinanciado.

## Conflicto de intereses:

No existe conflicto de intereses en este manuscrito. Si existiera, sería declarado en este documento y/o explicado en la página del título.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paneque T, Castillo H, Piquera Y, Infante M, Ramírez M. Relación entre factores de riesgos y caries dental. MULTIMED Granma. 2018 Jul; 19(4).

2. Graciano M, Correa YA, Martínez CM. Streptococcus mutans y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. Rev Nac Odontol. 2012 Jan; 8(14):32-45.
3. Aurea S, Soro A. Solving the etiology of dental caries. Curr Trends Microbiol. 2015 Feb; 23(2): 76-82.
4. Dilip G, Sham SB, Beena A. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of Aloe vera tooth gel and two popular commercial toothpastes: an in vitro study, Gen Dent. 2009; 57(3):238-241.
5. Ojeda JC, Oviedo GE, Salas LA. Streptococcus mutans and dental caries. CES Odontol. 2013 Jun; 26(1): 44-56.
6. Rivadeneira D, Álvarez P. Aceite esencial de A Schinus molle L. (Molle) como potencial antimicrobiano sobre Streptococcus mutans. Estudio in vitro. Kiru. 2015; 12(2):8-14.
7. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Intercult Ethnopharmacol. 2003 Oct; 88(2-3):199-204.
8. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. Clin Microbiol Infect. 2014 April; 33(4):499-515.
9. Pooja D, Pandurang A, Kaushik B, Dasharath O. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (Vitis vinifera L) byproducts. J Food Sci Technol. 2015 Jan; 52(1):181-190.
10. Lars M, Jennifer A, Jan M, Nicolai K. Production of plant-derived polyphenols in microorganisms: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Feb; 102(4):1575-1585.
11. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol. 2012 Apr; 23(2):174-181.
12. Jiménez M, Sammán N. Caracterización química y cuantificación de fructooligosacáridos, compuestos fenólicos y actividad antirradical de tubérculos y raíces andinos cultivados en el noroeste de Argentina. ALAN. 2014; 64(2):131-135.
13. Vasco C, Ruales J, Kamal A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. Food Chem. 2008 Apr; 111(4):816-823.
14. Serra M. Política antimicrobiana. Necesidad imperiosa ante la creciente resistencia microbiana actual. Rev haban cienc méd. 2017 Jul; 16 (4):564-578.
15. Massón M, Armas A. Comparación de la efectividad antibacteriana de la stevia rebaudiana sobre streptococcus mutans y streptococcus sanguinis. KIRU. 2016; 13(2):127-132
16. Delgado AJ, Gamero SE, Valdés SE. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (Vitis vinifera L.). Food Sci Nutr. 2011 Sep; 51(18): 2481-2485.
17. Carbone Z, González MM, Martínez SE. La Saliva: Una Mirada Hacia El Diagnóstico. CNH RAAO. 2016; 55(2): 39-43.
18. Berradre M, Vides A, Ojeda G, Soto L, Sulbarán B, Fernández V, et al. Caracterización fisicoquímica y actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva (Vitis vinifera) variedad Malvasía. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2016 Feb; 33(1): 619-625.
19. Paladino SC, Zuritz CA. Extracto de semillas de vid (Vitis vinifera L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. Rev. FCA UNCUYO. 2011 Abril; 43(1): 187-199.
20. Swadas M, Dave B, Vyas SM, Shah N. Evaluation and Comparison of the Antibacterial Activity against Streptococcus mutans of Grape Seed Extract at Different Concentrations with Chlorhexidine Gluconate: An in vitro Study. IJCPD. 2016 Jul; 9(3):181-185.
21. Garcia SS, Blackledge MS, Michalek S, Su L, Ptacek T, Eipers P, et al. Targeting of Streptococcus mutans Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. Adv Dent Res. 2017 Mar; 96(7):807-814.
22. Galarza C, Armas A, Núñez MA. Myrtus communis como alternativa natural sobre cepas de microorganismos bucales: streptococcus mutans y streptococcus sanguis. Kiru. 2016; 13(1):45-50.