

Efecto inhibitorio del jugo de arándano (*Vaccinium Macrocarpon*) sobre microorganismos en saliva de niños: estudio "in vitro"

Inhibiting effect of cranberry juice (*Vaccinium Macrocarpon*) on saliva microorganisms of children: in vitro study"

Resumen

Objetivo. Determinar in vitro el efecto inhibitorio del jugo de Cranberry (sp. *Vaccinium Macrocarpon*) sobre microorganismos encontrados en saliva de niños. **Material y métodos.** 80 muestras salivales de niños entre 6 y 9 años de edad, ambos sexos, de una escuela urbana del estado de Tlaxcala fueron sembradas para su cultivo, aislado e identificación por género y especie por duplicado en medios específicos sobre cajas de Petri a 37 °C por 24hr. Pozos con extracto de Cranberry se colocaron dentro de los medios de cultivo para observar el halo de inhibición creado. Las cepas resistentes se identificaron mediante la tinción de Gram. **Resultados.** De los 80 especímenes expuestos, 77 (96.25%) mostraron sensibilidad y 3 (3.75%) presentaron resistencia. El halo inhibitorio fue de 19.27mm (sd=6.08). Los microorganismos predominantes fueron el *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y el *Streptococcus salivarius*. De un total de 168 microorganismos aislados el 97% (N=163), mostraron una alta sensibilidad y solo un 2% (N=5) mostraron resistencia entre ellos el *Klebsiella rhinoscleromatis*. **Conclusiones.** El extracto de jugo de arándano americano (*Vaccinium macrocarpon*) mostró sensibilidad en la mayoría de los microorganismos encontrados en la saliva de niños. La resistencia de los microorganismos aislados fue mínima. Gracias a sus propiedades el jugo de arándano tiene efectos promisorios como agente anticaries efectivo y seguro.

Abstract

Purpose. The aim of this in vitro study was to determine the inhibiting effect of Cranberry juice (*Vaccinium macrocarpon*) on microorganisms found in saliva samples of children. **Methods.** 80 saliva samples of children between 6 and 9 yo, both sex, of an urban primary school in Tlaxcala, were cultivated in specific media (37° C for 24 hr) isolated and identified by species and gender. 5mm holes with Cranberry juice were set into the cultures to observe the inhibiting halo effect. Resistant stubs were identified by Gram dye. **Results.** A total of 80 samples were obtained, 77 samples (96.25%) showed sensibility

to Cranberry juice and 3 samples (3.75%) showed resistance. The inhibition halo has a ratio of 19.27 mm(sd=6.08). Predominant microorganisms were *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus salivarius*. From 168 isolated microorganisms, 97% (N=163) showed high sensibility and 2% (N=5) were resistant, vg. *Klebsiella rhinoscleromatis*. **Conclusions.** American Cranberry juice (*Vaccinium macrocarpon*) showed high sensibility on saliva microorganisms found in children. Resistance of isolated microorganisms was very low. Because of its properties Cranberry juice is a promise anti-carries agent, safe and effective.

Descriptor: arándano, polifenoles, saliva, efecto inhibitorio, microorganismos

Keyword: cranberry, polifenols, saliva, inhibiting effect, microorganisms

Rubén Muñoz Solgado*
América PadillaTzompa**
Óscar Pérez Toriz***

*Profesor Titular de la Especialidad en Estomatología Pediátrica
Autor responsable

**Alumna egresada de la Especialidad en Estomatología Pediátrica

***Profesor asociado de la Especialidad en Estomatología Pediátrica

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Muñoz, S.R., Padilla, T.A., Pérez, T.O. Efecto inhibitorio del jugo de arándano (*Vaccinium Macrocarpon*) sobre microorganismos en saliva de niños: estudio "in vitro". Oral Año 14. Núm. 46. 2013. 1030-1034

Recibido: Agosto, 2013. Aceptado: Noviembre, 2013.

Oral. Año 14 No. 46, Diciembre, 2013.

Introducción

En la actualidad existen una amplia variedad de frutos muy apreciados por su potencial terapéutico atribuido al contenido de componentes conocidos como fitoquímicos bioactivos.^{1,2} Dichos compuestos de origen natural han despertado un creciente interés debido a que son una rica fuente de sustancias bioactivas y estructuralmente complejas con propiedades antimicrobianas que podrían ser útiles en el desarrollo de terapias anticáncer alternativas o coadyuvantes.^{3,4,5}

Un ejemplo son los polifenoles, sustancias con propiedades benéficas para la salud, incluyendo la actividad antimicrobiana.^{1,4} Al ser la dieta, uno de los múltiples factores que definen la salud oral, la investigación se ha centrado en productos naturales, y frutos como el Arándano Americano o Cranberry que han recibido especial atención debido a sus contenidos únicos de polifenoles.⁶

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante.⁷ Existen 15 tipos principales y entre ellos, los flavonoides contienen la mayor variedad de compuestos con actividad farmacológica.^{9,10} La estructura básica de un flavonoide (figura 1b), consta de dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono, formando un anillo heterocíclico.¹ Una subclase de los flavonoides son los flavan-3-ol (figura 1e), semejantes a los flavonoides en su estructura, pero no tienen el grupo cetona en el carbono C4.^{1,6,8} El flavan-3-ol, se polimeriza formando proantocianidinas o "taninos condensados" con peso molecular variado (figura 2).^{1,19}

Cuando los monómeros se unen entre sí por un enlace simple en el anillo B, los oligómeros formados se denominan proantocianidinas de tipo B y si están unidos por enlaces dobles, se denominan proantocianidinas de tipo A. Las proantocianidinas de tipo A son el principio activo responsable de las actividades biológicas atribuidas al Cranberry.¹⁰

El Arándano americano o Cranberry de fruto grande (*Vaccinium macrocarpon*) pertenece a la familia *Ericaceae* del género *Vaccinium*. Ha sido usado por tribus norteamericanas como medicina para curar heridas y contra el envenenamiento.^{11,12} El Cranberry americano contiene cuatro grupos fenólicos que incluyen ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoles, flavan-3-ol y proantocianidinas oligoméricas tipo A (figura 2).⁷

De acuerdo a estos datos, es posible que el Cranberry tenga la posibilidad de ser empleado en la terapia odontológica preventiva; no obstante no existen estudios orales "in vitro" específicos y suficientes respecto al grado de sensibilidad sobre los microorganismos encontrados en la cavidad bucal y por consiguiente su función como agente inhibidor y/o bactericida.

Objetivos. 1.-Determinar "in vitro" el efecto inhibitorio del extracto del jugo de Arándano (*Vaccinium macrocarpon*), sobre microorganismos encontrados en saliva de niños, mediante la formación del halo inhibitorio. 2.-Aislar las bacterias encontradas en las muestras salivales sobre medios específicos e identificar aquellos microorganismos sensibles y resistentes al extracto de Arándano.

Material y método

El diseño del estudio fue prospectivo, transversal, descriptivo y experimental, aprobado por el comité de investigación de la Facultad de Odontología de la UATx y comprendió tres etapas, la primera consistió en una prueba piloto con 20 muestras salivales de niños entre 6 y 9 años de edad asistentes a la Clínica de Estomatología Pediátrica de la UATx, siguiendo el esquema de trabajo que se detalla a continuación. La segunda etapa consistió en la toma de 80 muestras de 1 ml de saliva de niños, de ambos sexos de una escuela urbana de la ciudad de Tlaxcala, integrada por selección homogénea. Las muestras fueron refrigeradas a -70°C por 24 horas, posteriormente sembradas en cajas Petri con un medio de cultivo específico (Agar sangre de carnero) e incubadas a 37°C por 24 horas. Dentro de caja se colocó con punta estéril, un pozo que contenía el extracto de jugo de Arándano. Las muestras se incubaron nuevamente a 37°C por 24 horas y después observadas para medir milimétricamente el halo de inhibición creado alrededor de los pozos. La tercera etapa consistió en la realización de la tinción de Gram y aislado de las bacterias encontradas en las muestras salivales sobre medios de cultivo diferenciales: Agar McConkey, Agar sal y manitol y Agar Mitis Salivarius. Al final realizaron las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de los microorganismos. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva.

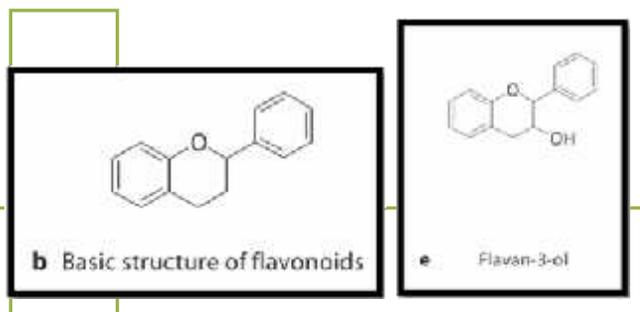


Figura 1.b.
Estructura básica del flavonoide.
Figura 1e.
Estructura del Flavan-3-ol.

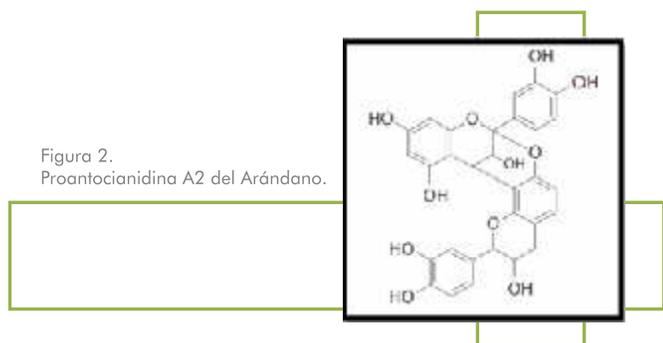
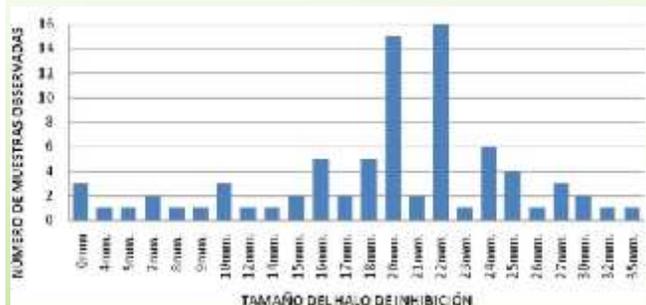


Figura 2.
Proantocianidina A2 del Arándano.

Resultados

Los resultados de los halos inhibitorios observados se presentan en la gráfica 1, la mayoría de los microorganismos mostraron ser sensibles al jugo de arándano. Los halos de inhibición (Figuras 3 y 4) se observaron en un rango de 0 hasta 35mm con una media de 19.27mm (Gráfica 1). Se aislaron un total de 14 especies de microorganismos (N=168) (Gráfica 2), el 91.07% (N=153) Gram positivos y 8.92% (N=15) Gram negativos, destacando el *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus salivarius* (Figura 5).

Distribución por tamaño del halo de inhibición

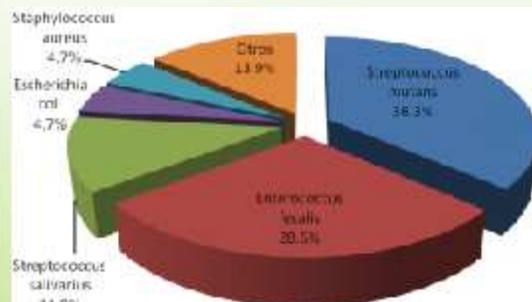


Gráfica 1.



Figura 4.
Comparación de los halos de inhibición. Los pozos superiores (experimental) con jugo de arándano; pozo inferior (control) con solución salina.

Distribución de frecuencias por tipo de Microorganismo aislado.



Gráfica 2.



Figura 3.
Halo inhibitorio notorio en pozos con jugo de arándano.

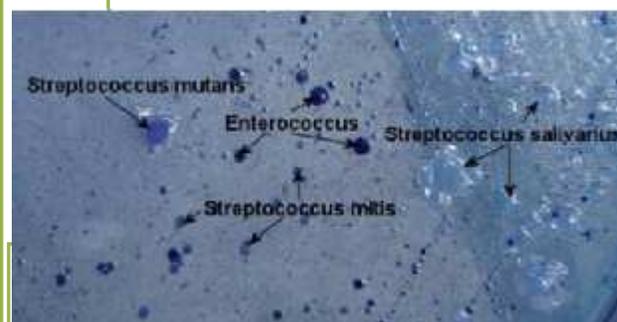


Figura 5.
Principales microorganismos identificados en las muestras.

Microorganismos como el *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Beta hemolíticos no A no B*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otros, mostraron ser 100% sensibles al jugo de arándano (Tabla 1). El *Streptococcus mutans* y el *Enterococcus faecalis* mostraron sensibilidad mayor al 90% y el *Escherichia coli* en un 87.5%. El único microorganismo identificado que mostro ser re-sistente al jugo de arándano fue la *Klebsiella rhinoscleromatis* a pesar de que solo se aisló en una muestra.

Porcentajes de Sensibilidad y Resistencia de los microorganismos aislados

MICROORGANISMO (MO)	TOTAL DE MO AISLADOS	SENSIBLES	%	RESISTENTES	%
<i>Streptococcus mutans</i>	61	59	97%	2	3%
<i>Enterococcus faecalis</i>	48	47	98%	1	2%
<i>Streptococcus salivarius</i>	211	210	100%	0	0%
<i>Escherichia coli</i>	8	7	87.5%	1	12.5%
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	8	100%	0	0%
<i>Streptococcus Beta -hemolítico no A no B</i>	7	7	100%	0	0%
<i>Streptococcus mitis</i>	7	7	100%	0	0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	100%	0	0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	100%	0	0%
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	1	100%	0	0%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	100%	0	0%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	100%	0	0%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1	100%	0	0%
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	1	0	0%	1	100%
Total de Microorganismos aislados	168	163		5	

Tabla 1.

Discusión

Diversos estudios in vivo e in vitro han demostrado la capacidad de los polifenoles para interferir selectivamente con los rasgos específicos de virulencia del *Streptococcus mutans*, impidiendo la adherencia a las superficies dentales, inhibiendo la actividad de la glucosiltransferasa (GTF) y fructosiltransferasa (FTF).^{6,7,8}

El efecto inhibitorio del jugo de arándano americano de la especie *Vaccinium macrocarpon* sobre microorganismos en saliva de niños fue comprobado. Koo H (2010) refiere que el arándano es el único fruto con un alto contenido de polifenoles y a su vez flavonoles donde se encuentran las proantocianidinas con enlaces tipo A, responsables de la actividad inhibitoria sobre la adherencia bacteriana.¹³ La mayoría de los estudios y ensayos clínicos (Rahbar y cols 2010, Castillo y cols 2007) respaldan los efectos benéficos del arándano en la salud del tracto urinario e intestinal impidiendo infecciones así como evitando la adherencia de bacterias sobre las células uroepiteliales y epiteliales gástricas; es por esto que se eligió dicho fruto para comprobar su efecto sobre la microbiología oral.^{14,15}

Las bacterias pueden expresar diferentes tipos de adherencia en función de las condiciones de cultivo; las proantocianidinas impiden la adherencia de bacterias como el *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *S. aureus*, *Enterobacterias* y *Klebsiella*.¹⁶ Parte de los obje-

tivos de este estudio fue aislar los microorganismos de la saliva en niños y se observó la presencia del *E. coli* la cual fue 87.5% sensible al jugo de arándano, contra un 12.5% resistente. Mientras que el *S. aureus* y *K. pneumoniae* mostraron ser sensibles en un 100%, concordando con los reportes de Rahbar y cols.

Las propiedades antiadhesivas del arándano fueron demostradas por Yoo y cols (2011) específicamente contra el *S. mutans* cariogénico.¹ En nuestro estudio el 97% del *S. mutans* mostró ser sensible. Otros reportes, mencionan el efecto inhibitorio de la porción fenólica del arándano sobre bacterias cariogénicas como *S. sobrinus* y *mutans* disminuyendo su hidrofobicidad, factor importante en la adherencia sobre la superficie dental.^{17,18} El biofilm formado por dichas bacterias es inhibido en presencia de la fracción polifenólica. En nuestro estudio no se identificó al *S. sobrinus*.

Weiss y cols (2004) aislaron constituyentes del alto peso molecular denominados Material no Dializable (MND), los cuales redujeron el conteo de *S. mutans*.²⁰ Labrecque y cols (2006), usando sensidiscos observaron que estos MND pueden inhibir la formación del biofilm y adherencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Forsythia nerella*, responsables de la destrucción del tejido periodontal junto con otras bacterias Gram

negativas.²¹ Estas inhiben la actividad proteolítica de origen bacteriano y tisular así como la producción de citoquinas.^{19,21}

Se ha observado que el efecto inhibitorio y anti-adherente sobre el biofilm oral, tiene relación directa con la concentración (Sethi y Godiva 2011). Por su parte, Boded y Yamanaka (2007), informan que la fracción MND puede limitar la multiplicación de especies anaerobias como *Porphyromonas gingivalis*, *Forsythia nerella* y *Treponema denticola*, propias de la zona subgingival y bolsas periodontales.²¹

Koo y cols (2010) describieron los componentes bioactivos específicos del extracto de cranberry, principalmente las flavonas y las proantocianidinas. Los reportes del efecto inhibitorio coinciden con los resultados de nuestro estudio. Aún no está claro el mecanismo exacto por el que las proantocianidinas interrumpen la producción ácida y la tolerancia ácida en presencia del *Streptococcus mutans*, un rasgo importante de la virulencia.^{23,24}

Las proantocianidinas interactúan directamente con la membrana bacteriana alterándola y afectando la glucólisis.^{23,24,25} Por otra parte, los polifenoles interfieren selectivamente con los rasgos específicos de virulencia del S mutans, impidiendo su adherencia a las superficie dental e inhibiendo la actividad de la glucosiltransferasa (GTF) y fructosiltransferasa (FTF).^{26,27}

Conclusiones

El objetivo de este estudio fue buscar agentes viables y seguros para la prevención de la caries dental; las proantocianidinas de los polifenoles contenidos en el jugo de arándano, prometen ser uno de estos compuestos potencialmente seguros. Si bien, las pruebas microbiológicas no son únicas para instaurar un protocolo definitivo, deben realizarse estudios clínicos controlados para determinar con mayor certeza la eficacia de un agente terapéutico.

El extracto de jugo de arándano americano (*Vaccinium macrocarpon*) mostró actividad antimicrobiana contra bacterias de saliva en niños. El efecto inhibitorio fue específico contra bacterias como *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus salivarius*. La resistencia de los microorganismos aislados al jugo de arándano fue mínima.

Bibliografía

- 1.-Yoo, S, Murata, R, Duarte, S. Antimicrobial Traits of Tea-and Cranberry-Derived Polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2011; 45:327-335.
- 2.-Drago, S.M.E., López, L.M., Espuñes, S.T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2006;37:58-68.
- 3.-Jeon, G., Rosalen, P.L., Falsetta, M.L. et al. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res* 2011;45:243-263.
- 4.-Groppo, F.C., Cássia Bergamaschi, C., Cogo, K. et al. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res* 2008;22:993-998.
- 5.-Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007;70:461-477.
- 6.-Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N. et al. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 2002;56:200-2007.
- 7.-Taylor, P.W., Hamilton-Miller, J.M., Stapleton, P.D. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull* 2005;2:71:81.
- 8.-Duarte, S., Gregoire, S., Singh, A. et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 2006;257:50-56.
- 9.-Gregoire, S., Singh, A.P., Vorsa, N. et al. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 1960-1968.
- 10.-Buzeta, A. Chile: Berries para el 2000. Departamento Agroindustrial Fundación Chile 1997: 133.
- 11.-México: Jalisco va por 12% del mercado de arándano. Fecha de publicación: 23/10/2007 tomado de http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=1067.
- 12.-Tavares, L., Fortalezas, S., Carrilho, C. et al. Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research* 2010;1:312.
- 13.-Koo, H., Duarte, S., Murata, R.M. et al. Influence of Cranberry Proanthocyanidins on Formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on Saliva-Coated Apatitic Surface and on Dental Caries Development in vivo. *Caries Res* 2010;44:1161-126.
- 14.-Castillo, J.I., Romero, I. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: Una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 2007;080:35-61.
- 15.-Rahbar, M., Diba, K. In vitro activity of cranberry extract against etiological agents of urinary tract infections. *Afr J Pharm Pharmacol* 2010;4(5):286-288.
- 16.-Johnson, W.B., Buquo, L., Zeinali, M. et al. Prevention of nonspecific bacterial cell adhesion in immunoassays by use of cranberry juice. *Anal Chem* 2006;78(3):853-7.
- 17.-Yamanaka, O.A., Sato, E., Kouchi, T. et al. Inhibitory Effect of Cranberry Polyphenol on Cariogenic Bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll* 2008;49(3):107-112.
- 18.-Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I. et al. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:8689.
- 19.-Bonifait, L., Grenier, D. Cranberry Polyphenols: Potential Benefits for Dental Caries and Periodontal Disease. *J Can Dent Assoc* 2010; 76:130-134.
- 20.-Weiss, E.I., Kozlovsky, A., Steinberg, D. et al. A high molecular mass cranberry constituent reduces *mutans streptococci* level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 232:89-92.
- 21.-Labrecque, J., Bodet, C., Chandad, F. et al. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(2): 439-43.
- 22.-Yamanaka, A., Kouchi, T., Kasai, K. et al. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 2007;42(6):589-92.
- 23.-Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A. et al. Microbial complex in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
- 24.-Boded, C., Chandad, F., Grenier, D. Anti-inflammatory activity of a high molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res* 2006;85(3):235-9.
- 25.-Yamanaka, A., Kimizuka, R., Kato, T. et al. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:150-154.
- 26.-Sethi, R., Godiva, V. Inhibitory effect of cranberry juice on the colonization of *Streptococci* species: An in vitro study. *J Indian Soc Periodontol*. 2011 Jan-Mar;15(1):46-50.
- 27.-Bowen, W.H., Koo, H. Biology of *Streptococcus mutans*- derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011;45:69-86.