

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
AREA MICROBIOLOGIA**

TITULO DEL TRABAJO

**INHIBICION DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE
STREPTOCOCCUS MUTANS POR PAPAINA Y
SANITREND**

**Nombre del Alumno:
Viviana Marisel Castro Arqueros**

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Nombre: Prof. Marta Kelly Gajardo Ramírez**

**TUTORES ASOCIADOS
Nombre: Dra. María Teresa Ulloa Flores
Prof. Leyla Gómez Carranza**

**Santiago - Chile
2005**

A mis padres adorados Jaime e Inés
A mis hermanas Kimena y Miyarell
Y a Rodrigo , mi gran amor...

Gracias por confiar en mí.

Agradecimientos

No puedo dejar pasar esta oportunidad para agradecer, de todo corazón, a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a que este sueño se hiciera por fin realidad:

- En primer lugar a mis padres por entregarme día a día su amor, sus valores y su compañía. Nunca dejaré de agradecer todos los esfuerzos y sacrificios que hicieron por nosotras.
- Agradecer a mis hermanas y a Antonio, no saben lo importante que fue para mí su compañía e incondicional apoyo en todos aquellos momentos difíciles que pasé durante estos 6 años.
- A mis niños Andrés, Rafael y Tomás por su cariño y por todos los momentos lindos que hemos pasado juntos.
- A Rodrigo que con su amor, su incondicional apoyo y compañía me incentivó día a día a salir adelante.
- Quiero expresar mi especial gratitud a una gran persona, mi profesora titular, la Dra Marta Gajardo, quien a parte de contribuir en mi formación académica en segundo año, colaboró incansablemente el desarrollo de este trabajo.
- De la misma forma deseo agradecer, por su excelente voluntad y colaboración a la Dra María Teresa Ulloa, del departamento de Micología-Microbiología de la facultad de medicina de la Universidad de Chile.
- Agradecer a todas las personas que forman parte de departamento de Microbiología de esta facultad. Por recibirnos día a día durante todo este tiempo, por su gran voluntad y paciencia para enseñarnos y mostrarnos lo agradable y lindo que puede resultar trabajar en un laboratorio. Gracias a la Dra Nora Silva, a la Dra Leyla Gomez, al Dr Moisés Arriagada y al Dr Jorge Huerta. A la Sra Angelica Carrasco y en especial a Jaimito Donoso.

- Agradecer a Daniela Guzmán, mi gran amiga y compañera de trabajo, por su perseverancia y por levantarme el ánimo cuando las cosas no nos salían como nosotras esperábamos. Dani eres una super persona.
- No puedo dejar de nombrar y agradecer de corazón a una persona que con su alegría y optimismo siempre me apoyó no solo a mí sino a muchos de nosotros y durante muchas generaciones, una persona muy especial y siempre digna la Sra Fresia a la cual guardaré un gran cariño y respeto por siempre.
- Finalmente agradecer a todas las personas de esta escuela que contribuyeron en mi formación académica, a mis docentes, ayudantes y auxiliares. En especial a las siguientes personas de las cuales aprendí mucho y espero algún día llegar a ser tan buena profesional y persona como ellos: Dra Marta Gajardo, Dr Danilo Ocaranza, Dr Miqueas Espinoza, Dra Ana María Gallardo y la Dra Rocío López de Maturana.

Índice

Introducción.....	pág. 5
Aspectos teóricos.....	pág. 8
Hipótesis.....	pág. 36
Objetivo General.....	pág. 37
Objetivos Específicos.....	pág. 37
Materiales y Métodos.....	pág. 38
Resultados y análisis de resultados.....	pág. 46
Discusión.....	pág. 60
Conclusiones.....	pág. 64
Sugerencia.....	Pág. 66
Resumen.....	pág. 67
Referencias bibliográficas.....	pág. 69

Introducción

La caries dental es una de las enfermedades de etiología bacteriana más comunes entre los seres humanos, y todavía es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, debido a que afecta la calidad de vida y personalidad de los individuos afectados además, requiere de una inversión personal y gubernamental importante, es incalculable el número de horas hombre que se pierde en el trabajo, el estudio y las labores del hogar a consecuencia de las enfermedades dentales y de su tratamiento. Esta enfermedad es producto de una serie de cambios gatillados por bacterias específicas, entre ellas *Streptococcus mutans*, presentes en la biopelícula de placa bacteriana supragingival. Estas bacterias mediante sus factores de virulencia son capaces de provocar la pérdida de minerales y posterior formación de una cavidad, debido al desequilibrio iónico en el proceso de mineralización y desmineralización de los tejidos duros del diente resultante del metabolismo de carbohidratos por parte de estas bacterias.

Streptococcus mutans, especie bacteriana perteneciente al grupo mutans streptococci y distribuida ampliamente en la población mundial, ha sido implicado como el principal agente etiológico de caries dental.

Numerosos estudios se han destinado a investigar sobre la prevención de enfermedades bucales, en especial caries dental, poniendo especial énfasis en las medidas que controlen la formación de placa bacteriana dental y así reducir la presencia del agente patógeno. Es así como, paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar sustancias naturales que posean propiedades farmacológicas antibacterianas. Entre ellas, se encuentran *papaína* y *Sanitrend*.

La *papaína*, enzima presente en las hojas y fruto de la papaya, es una enzima proteolítica que facilita la digestión de la carne y todas sus proteínas, es de gran utilidad en la prevención de los problemas hepatobiliares, mejora el ritmo cardiaco, posee efecto antiinflamatorio (permite atacar las celulitis dolorosa que cursa con edema), además es antibacteriana y antifúngica. En el ámbito odontológico se ha visto que reduce significativamente “in vivo”, la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans*.

Sanitrend, otra sustancia de origen natural que ha mostrado poseer interesantes propiedades medicinales, es un poderoso biocida orgánico

natural, basado en extractos de semillas de cítricos, que presenta poderosa acción bactericida y fungicida de amplio espectro. Es biodegradable, no tóxico, no corrosivo y no irritante. Su alta potencia permite el uso de bajas concentraciones del producto para lograr los efectos esperados. En el ámbito odontológico no se han reportado estudios que avalen su efectividad sobre patógenos bucales.

La actividad antimicrobiana de sustancias frente a un microorganismo dado se puede evaluar a través de métodos cualitativos y cuantitativos, dentro de éstos últimos tenemos la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) que consiste en establecer la menor concentración de un antibiótico capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo, esto se puede realizar mediante varias técnicas, una de ellas es la técnica de dilución en agar. Es por ello que el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar *in vitro*, el efecto de *papaína* y *Sanitrend* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* y determinar la CIM de ambos biocidas por el método de dilución en agar.

Aspectos teóricos:

1.-CARIES DENTAL

La caries dental junto con la enfermedad periodontal, son las enfermedades infecciosas de etiología bacteriana más comunes en los seres humanos (1,2). La caries dental aún es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, calculándose que aproximadamente un 90% de la población mundial es afectada por esta enfermedad en algún momento de la vida (6). La caries dental es una patología de alto costo tanto, para el individuo como para la sociedad. Consume tiempo y dinero; es incalculable el número de horas hombre que se pierde en el trabajo, el estudio y las labores del hogar a consecuencia de las enfermedades dentales y de su tratamiento (1,2,10). Además, la caries dental conlleva otros costos, que aunque intangibles, afectan la calidad de vida de las personas. Entre estos hay que considerar el dolor, el cual varía, desde la

sensación aguda sentida al comer hasta el dolor pulsante asociado a la hipersensibilidad térmica y a la inflamación de la pulpa dentaria (1,3).

La caries dental tiene implicancias relativas en la salud general, pues la dentadura no sólo es esencial para una buena masticación de los alimentos permitiendo una deglución y digestión correcta de los mismos, sino que también, si está infectada puede llegar a ser un foco infeccioso con efectos sistémicos, como ocurre en el caso de la endocarditis bacteriana subaguda, partos prematuros y niños con bajo peso al nacer. Característica notable de la enfermedad, es su efecto en la estética y en la actitud personal, otro costo intangible, ya que la dentadura está íntimamente relacionada con la sonrisa, el lenguaje y con la propia personalidad de los sujetos (1,5).

La caries dental se debe reconocer como un proceso patológico importante en la historia del hombre, un problema universal y costoso que ha de ser afrontado por la odontología. Su carácter peculiar deriva de ser producida por una microbiota compleja de placa dental supragingival, de su condición progresiva, coste, sufrimiento y efectos sobre la salud y personalidad de las personas afectadas.

En 1986 Walter Loeshe describe la caries y la enfermedad periodontal como...”quizá las infecciones más caras que tienen que afrontar las personas a

lo largo de sus vidas” (1). Esta afirmación sigue teniendo validez en la actualidad.

1.1.-Etiología de la caries dental:

La caries dental es fundamentalmente una enfermedad polimicrobiana que afecta a los tejidos calcificados de los dientes. Según la OMS *“caries es aquella lesión patológica que reblandece los tejidos duros del diente y que llega a formar una cavidad en estos tejidos”* (4). Esta enfermedad es producto de una serie de cambios que ocurren por el desequilibrio iónico en el proceso de desmineralización y remineralización de los tejidos duros del diente, dicho desequilibrio iónico resulta del metabolismo de los carbohidratos por parte de las bacterias presentes en la biopelícula de placa dental supragingival (1,2). Este proceso, en consecuencia, puede provocar la pérdida de minerales con la posterior formación de una cavidad si no se interviene a tiempo, pues dicha pérdida de sustancia dentaria representa una etapa tardía de un proceso patológico que ha progresado durante meses o años (1-3,5,10). Es importante comprender que las cavitaciones de los dientes son signo de infección bacteriana (1).

Por ser la caries dental una enfermedad bacteriana infectocontagiosa de etiología multifactorial (Keyes 1960), es importante tener claro cuales son los eventos claves involucrados en su iniciación para así poder identificar los agentes terapéuticos que permitan eliminar y controlar el proceso de la enfermedad (4).

Se han propuesto dos hipótesis básicas, aunque contrapuestas, sobre la patogenia de la caries. La hipótesis más antigua y más aceptada, reconoce la presencia universal de microorganismos potencialmente patógenos en la placa bacteriana dental y asume que todas las acumulaciones de ésta son patógenas, dando origen a la *Hipótesis de placa inespecífica*. En base a esta teoría se creó un modelo de manejo quirúrgico de tratamiento dental en el cual el diagnóstico no era de importancia, ya que consideraba que todos los dientes tienen placa con bacterias odontopatógenas y por lo tanto todos los individuos presentan la enfermedad. El problema de esta hipótesis radica en que obliga a eliminar completamente la placa en *todos* los pacientes (1,3). Este objetivo es poco realista, ya que es difícil de lograr incluso en los pacientes mejor predispuestos. La principal falencia en esta teoría es el no considerar que en la cavidad bucal se desarrollan distintos ecosistemas microbianos, lo que dio paso a que en la década de los sesenta comenzara a ser cuestionada (3).

La segunda hipótesis se basa en la observación de que la placa bacteriana dental no siempre se acompaña de alteraciones del esmalte y asume que la placa es patógena únicamente cuando existen signos de enfermedad, dado que existiría un número limitado de microorganismos, principalmente bacterias, capaces de provocar caries dental y enfermedad periodontal y que los restantes microorganismos presentes en la placa estarían en equilibrio con el hospedero. Esta es la *Hipótesis de placa específica* (Loesche 1976). El tratamiento basado en esta segunda hipótesis va dirigido a eliminar los microorganismos patógenos específicos, no la totalidad de la placa, para lo cual el diagnóstico clínico-microbiológico es esencial (1,3). En palabras de Loeshe “el objetivo del tratamiento consiste en suprimir la placa cariogénica y sustituirla por placa libre de microorganismos patógenos, esto podría lograrse si se pudieran aplicar medidas antibacterianas (como el debridamiento mecánico y el empleo de productos químicos) con suficiente intensidad para conseguir cierta esterilidad en la superficie del diente durante cortos periodos de tiempo, de modo que la placa que se forme a continuación derive de los microorganismos presentes en la saliva y contenga grandes cantidades de *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* y proporciones reducidas de *Streptococcus mutans*” (1,3, 10).

Como se ha señalado, la caries dental es una enfermedad multifactorial. Numerosos autores han reconocido y descrito este proceso como dependiente de tres grupos importantes de factores: 1.- *microbianos*, 2.-*del substrato (la dieta consumida)* y 3.-*factores propios del huésped representado por los dientes* (1-3,7). Estos tres factores son los factores primarios que inciden en la producción de la caries dental y representan la clásica “Triada de Keyes”, a la que posteriormente, se le agregó un cuarto factor que es el *tiempo*, estableciendo así la “Triada de Keyes Modificada”(3). Para que se desarrolle caries dental estos factores no sólo deben estar presentes, sino que también interactuar en condiciones óptimas; un hospedero con tejidos susceptibles (dientes), colonizado por una microbiota con potencial cariogénico, consumiendo con frecuencia (tiempo) una dieta rica en sacarosa. A partir de estas condiciones pueden desarrollarse placas dentales dominadas por bacterias y después de algún tiempo aparece la lesión de caries (3)

Los factores secundarios tales como la saliva, exposición al flúor, higiene oral y otros aumentan o disminuyen la resistencia de los dientes, la cariogenicidad del sustrato local (dieta) y el potencial cariogénico de la microbiota. En otras palabras, pueden modular la actividad de la caries (1,3). Los factores terciarios son la *educación* y la motivación odontológica, si bien este último podría formar parte de los factores secundarios, debe destacarse

en forma separada dado el importante rol que juega en la enfermedad. De hecho, el profesional y el paciente no consiguen ningún éxito en el tratamiento si el paciente no está suficientemente educado y motivado en el cuidado de su salud bucal (3).

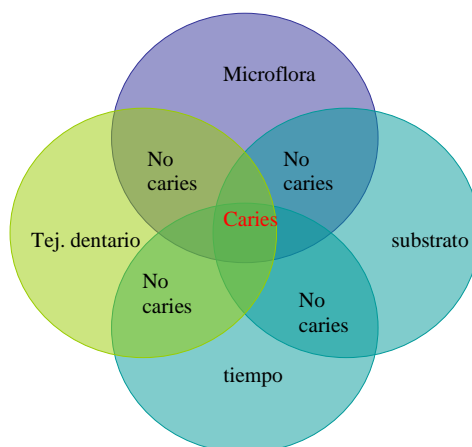


Fig.1 Representación gráfica de los parámetros involucrados en el desarrollo de caries dental en humanos (35).

1.2.-Placa bacteriana dental:

Durante años se ha puesto especial interés en determinar la función ejercida por la placa bacteriana dental en el inicio de la lesión cariosa en

lugares específicos del diente. La placa dental ha sido definida como: *una masa blanda, translúcida y muy adherente que se acumula sobre la superficie de los dientes, formada casi exclusivamente por bacterias y sus subproductos* (1,3). La OMS la define como “*Una entidad bacteriana proliferante, enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria y que por su actividad bioquímicamente metabólica ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries*” (4). Su acumulación constituye una sucesión de acontecimientos muy ordenados y perfectamente organizados (1-3).

La formación de placa dental sobre la pieza dentaria expuesta al medio bucal, aunque haya sido prolijamente escobillada, comienza a los pocos minutos cuando se deposita sobre ella una capa acelular mucinosa, libre de bacterias llamada “cutícula dentaria” o película dental adquirida (PDA). Luego, diversas formas bacterianas se agregan a ella adhiriéndose mediante uniones iónicas, electrolíticas o de tipo ligando-lectina y la colonizan, comenzando a elaborar el dextrán, un polisacárido extracelular de alto peso molecular, viscoso y muy adherente, el cual se produce exclusivamente a partir de la sacarosa (3). Sólo algunas especies bacterianas, en especial *Streptococcus mutans*, son capaces de adherirse a las superficies bucales como la mucosa y superficie dentaria (4). Estas bacterias adherentes disponen de

receptores especiales y producen además, una matriz pegajosa, el dextrán, que les permite cohesionarse fuertemente entre sí. Una vez que se fijan los microorganismos pioneros proliferan y se extienden lateralmente formando una cubierta similar a una estera sobre dicha superficie. El crecimiento bacteriano posterior es en volumen, vertical sobre la superficie del diente (hacia el exterior). La cubierta mixta streptococcica resultante permite que se adhieran otros microorganismos como bacterias filamentosas y espirales, que de otro modo no podrían fijarse a la superficie dentaria. Por consiguiente, la formación de una placa madura conlleva una serie de cambios y cada uno dependerá de la fase previa durante la que se preparan las condiciones locales para la siguiente fase (1-3,10) Entre los 4 y 10 días ya se puede observar una placa bacteriana dental madura(4).

1.3.- *Streptococcus mutans*

A los microorganismos que producen caries se les denomina *cariogénicos*. *Streptococcus mutans* ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental. Los *Lactobacillus* son las bacterias que prosperan en el medio carioso y contribuyen a la progresión de la enfermedad (4).

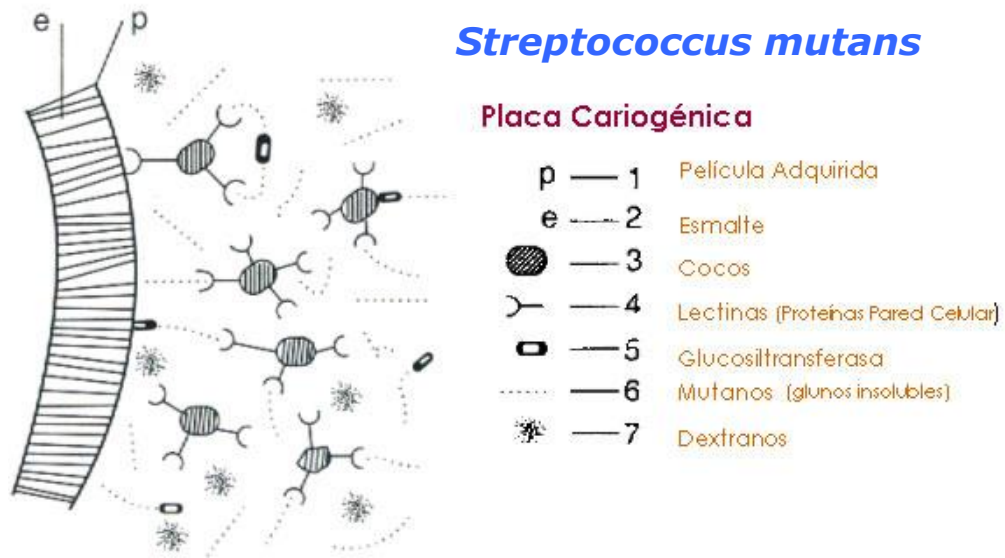
El rol de *Streptococcus mutans*, en cuanto a su participación en la iniciación y progresión de la caries dental ha sido estudiado durante muchos años. Algunas características fenotípicas de estas bacterias son determinantes en su cariogenicidad. Su capacidad de virulencia está asociada a varios factores, como son su poder acidogénico, ya que metaboliza hidratos de carbono a ácidos; poder acidofílico pues es capaz de crecer a pH 5.2 y su carácter acidúrico, ya que puede mantenerse metabólicamente activo a pesar de un pH bajo (2-4,8-10). Hay que destacar que no todas las cepas poseen estas características y que unas son más patógenas que otras (4-10), por lo que ha cobrado una gran relevancia el estudio de variantes genotípicas dentro de la especie. Las propiedades de patogenicidad de algunas de ellas permiten su adaptación y crecimiento sobre la película adquirida del esmalte y así la colonización del diente. En esta etapa influyen, también factores exógenos como el mayor o menor consumo de sacarosa en la dieta. Para que *Streptococcus mutans* se disemine entre las superficies dentarias debe estar presente en cantidad suficiente en la saliva, para poder vencer la resistencia a la colonización que opone la microbiota bucal normal (3,4,6,7).

La habilidad de *Streptococcus mutans*, en cuanto a su participación en la formación de placa bacteriana, está relacionada con la producción de las glucosiltransferasas, enzimas que tienen un rol principal en las interacciones

adhesivas y expresión de virulencia de estos microorganismos debido a que catalizan la síntesis de polisacáridos extracelulares (glucanos solubles e insolubles en agua) que promueven la adhesión de estreptococos cariogénicos a la superficie del diente (1,2,9,10,13). Dichas enzimas proporcionan a la célula un sustrato de dónde obtener energía y mantener la producción de ácido durante largos periodos de tiempo (13). A partir del metabolismo de la sacarosa estos microorganismos producen principalmente ácido láctico, el cual es fundamental en la virulencia debido a que, aparentemente, es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente (4). Otra característica del *Streptococcus mutans* es su corto efecto post-pH, que puede definirse como el tiempo necesario para recuperar su actividad de crecimiento habitual, tras estar sometido a un bajo pH éste vuelve a la normalidad. Según lo expuesto, no es de extrañar que estas especies bacterianas sean las que consigan alcanzar más rápidamente el pH crítico 4.5 necesario para iniciar el proceso de desmineralización. *Streptococcus mutans* forma parte de la microbiota normal de la boca y aparece junto con la erupción de las piezas dentarias, pero se hace patógeno al aumentar su proporción relativa en la boca (4).

Streptococcus mutans es una bacteria cocacea, Gram positiva, microaerófila. Para poder crecer y desarrollarse “in vitro” necesita de

medios enriquecidos y un ambiente con baja tensión de oxígeno, sus células se disponen en cadenas (10,32).



1.4:- Grupo *mutans streptococci*

La especie *Streptococcus mutans* se encuentra distribuida ampliamente en la población mundial y pertenece al grupo “*mutans streptococci*” constituido por diferentes grupos cuya diferencia serológica puede ser detectada mediante la técnica de inmunodifusión en agar (4,10). Este grupo se definió dada la heterogeneidad serológica, genética y biotípica que se detectó en la especie *Streptococcus mutans* sobre la base de antígenos carbohidratados, se pudo reconocer ocho serotipos dentro de esta especie. Estudios de hibridación de DNA revelaron la existencia de cuatro grupos genéticos diferentes, los que fueron elevados al “status” de especie y se les

denominó de acuerdo a la fuente de aislamiento. *Streptococcus mutans* fue el nombre que se les asignó a los aislados humanos de *mutans streptococci* cuyas cepas contienen los antígenos *c,e,f*. El serotipo *c* representa el 70% de los aislados humanos, es la especie que representa mayor prevalencia en el mundo, le sigue en frecuencia el serotipo *d* presente en *Streptococcus sobrinus* que contiene los antígenos *d,g,h*. *Streptococcus rattus* (serotipo *b*) proviene de aislados de ratas de laboratorio, *Streptococcus cricetus* (serotipo *a*) proviene de aislados de hámster de laboratorio. Estas dos últimas especies son ocasionalmente aisladas de placa bacteriana dental humana. *Streptococcus ferus* es aislada de ratas salvajes, posee serotipo *c*, sin embargo su origen genético no está relacionado con *Streptococcus mutans*. Al igual que *Streptococcus macacae*, también con serotipo *c*, pero con características diferentes a los *Streptococcus mutans* (3,10). Otras características diferenciales del grupo *mutans streptococci* se presentan en la tabla 1

Tabla 1: Características diferenciales del grupo *mutans streptococci*

<i>mutans streptococci</i>	Cariogénico		Serotipo(s)	Carbohidratos de la pared celular	Contenido DNA G+C (mol%)
	Animales	Humanos			
<i>S. mutans</i>	+	+	<i>c,e,f</i>	Glucosa, ramnosa	36-38
<i>S. sobrinus</i>	+	¿?	<i>d,g,h</i>	Glucosa, galactosa, ramnosa	44-46
<i>S. cricetus</i>	+	-	<i>a</i>	Glucosa, galactosa, ramnosa	42-44
<i>S. rattus</i>	+	-	<i>b</i>	Glucosa, ramnosa	41-43

<i>S. ferus</i>	-	-	c	¿?	43-45
<i>S. macacae</i>	¿?	-	c	Glucosa, ramnosa	35-36

G+C: contenido guanina-plus-citosina.(10)

Estudios epidemiológicos realizados en Chile en escolares de entre 9 y 12 años, para identificar y determinar la prevalencia de los diferentes biotipos y serotipos de *Streptococcus mutans*, muestran que tanto en placa bacteriana dental como en saliva el más frecuente es el serotipo c/e/f, biotipo I (95%) de *Streptococcus mutans*, seguido del serotipo d/g, biotipo IV de *Streptococcus sobrinus* (8)

En la literatura existen numerosos estudios destinados a investigar sobre la prevención de enfermedades bucales, poniendo énfasis en medidas que controlan la formación de placa bacteriana. La remoción de ésta a través del cepillado con un dentífrico, más el uso regular de seda dental y una agente quimioterápico, son de gran utilidad (11-12).

En relación con estos últimos, existe una gran variedad de agentes químicos anti-placa bacteriana los que según su forma de acción se clasifican en cinco categorías:

1. Antisépticos de amplio espectro: como son las bis-guanidinas y compuestos fenólicos.

2. Antisépticos que inhiben o destruyen grupos específicos de bacterias con la posibilidad de desarrollar resistencia bacteriana: penicilinas, eritromicina entre otros.
3. Enzimas que destruyen o dispersan la matriz de la placa o bien modifican su actividad: mucinas, dextranasas, proteasas y otros.
4. Agentes no enzimáticos, dispersantes, desnaturalizantes, que alteran la estructura o actividad metabólica de la placa bacteriana: peróxido de urea.
5. Agentes que interfieren en la unión de todas o algunas bacterias en la biopelícula: siliconas (14).

2. SUSTANCIAS NATURALES CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS:

Paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano (15-18).

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas primitivas en el tratamiento de enfermedades (16). Durante mucho tiempo los fármacos naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el

único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de especies vegetales con propiedades medicinales y que se ampliara la investigación a cerca de los productos que de ellas se extraen (16-18).

La *fitoterapia*, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, la que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los fármacos que entonces utilizaban se siguen usando hoy en día (17).

La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples, debido a que poseen más de un principio activo, éstos corresponden a compuestos químicos propios de la planta que están sometidos a una serie de variables físicas tales como: humedad del suelo, condiciones de luz, temperatura, factores ambientales, entre otros(15-17). La estandarización de estas variables, así como el control de calidad aplicado a todas las fases de su elaboración y a los resultados clínicos observados en estudios randomizados y de doble ciego han permitido que la Organización Mundial de la Salud (OMS)

publique monografías sobre algunas de las plantas medicinales con mayor respaldo científico (16).

Se debe destacar que los fármacos a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos siempre están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse biológicamente entre sí, de forma tal que en general no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados (16). Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos acerca de las plantas medicinales, aún no se conocen muchos de los principios activos a los que deben sus extraordinarias propiedades.

En el ámbito odontológico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos extractos de plantas con el fin de ayudar en el control de la placa bacteriana y por consiguiente en la disminución de la incidencia de caries dental y enfermedad periodontal (15).

Wolinsky et al (1983) publicó un artículo sobre el efecto que tenía un extracto de plantas nigerianas masticables sobre la placa bacteriana. Observó

que algunas de esas sustancias tenían influencia en la adherencia de *Streptococcus mutans* a la superficie del diente, disminuyendo de manera significativa la cantidad de esta bacteria en la placa bacteriana dental (15).

Sachi et al (1993) publicó un trabajo a cerca de la acción antimicrobiana de ciertas plantas como el “green tea”, extracto de té negro y “flavono flavor” sobre algunas bacterias bucales responsables de la caries dental y enfermedad periodontal y sugiere como resultado que dichas sustancias muestran ser efectivas en reducir patología periodontal y halitosis (15).

2.1.- Papaína

En el año 1900 Harlan preconiza el uso de una solución para la irrigación de conductos radiculares teniendo como base la *Papaína* también conocida con los nombres de *Carica papaina* o *Papenzima*. Es una enzima proteolítica similar a la pepsina humana que se extrae de la papaya, fruta tropical de la familia de las caricáceas, originaria de América Central y empleada desde hace muchos años por sus excelentes propiedades (18-20). Posee un mercado mundial creciente el cual está asociado a las numerosas nuevas aplicaciones descubiertas en la industria alimentaria, textil, farmacéutica, cosmética y artesanal (19-21).

La papaya, una fruta rica en vitaminas y minerales, posee dos componentes biológicamente activos: la *Quimopapaína* y la *Papaína* ambas contenidas en las hojas del árbol y el látex de la fruta no madura. La primera es más estable en el medio ácido pero su actividad proteolítica es menos marcada.

La producción de *papaína* en Chile tiene dos fases: en la primera se cultivan los papayos que son plantas jóvenes entre tres y cuatro años, los que son renovados mediante cultivo rotatorio. Posteriormente se realiza la extracción del látex, que es un líquido blanco obtenido mediante cortes en los frutos inmaduros a partir del cual se obtiene la *papaína*. Luego, en el laboratorio se separa y purifica la enzima hasta alcanzar niveles óptimos para su uso.

Land y Roger en el año 1969 observaron que la *papaína* es una enzima proteolítica de 20,900 Da, compuesta por 17 diferentes aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un sitio activo con un grupo tiol (SH) libre (26). Esta enzima se caracteriza por actuar en bajas dosis y ser de poca especificidad. Hidroliza tanto las proteínas como péptidos de menor tamaño, actuando preferentemente sobre aminoácidos básicos (leucina, arginina y fenil-alanina). También actúa sobre amidas y ésteres (18).

La *papaína* es activada por la cisteína, el tiosulfato (compuesto de azufre) y el glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos (zinc, cadmio, hierro, plomo), oxidantes (H₂O₂, radicales libres, etc) y por agentes que reaccionan con tioles (ácido ascórbico). (18)

2.1a.- Propiedades de la *Papaína*

Diversos estudios han demostrado que esta enzima es eficaz en agilizar las cicatrizaciones tanto internas como externas, se ha utilizado con gran éxito para contribuir a la cicatrización de úlceras plantares en pacientes con lepra y úlceras varicosas (18,20,22). Además, mejora el ritmo cardiaco, digiere proteínas muertas de modo que no influyan en el funcionamiento de las demás (18,20), disminuye inflamaciones intestinales y de las vías respiratorias permitiendo el tratamiento de edemas localizados como amigdalitis y faringitis (18,20), ayuda a conservar la piel sana, defiende al organismo de infecciones y alergias (18,20). Otros estudios han demostrado que la *carica papaína* presenta acción antibacteriana pues inhibe el crecimiento de microorganismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y Gram negativos como *Escherichia coli*, *Porphyromona vulgaris*, *Salmonella* entre otros (18,20,24). Se ha demostrado que también es efectiva inhibiendo hongos levaduriformes como *Cándida albicans* (18,24). Actúa como laxante suave y

combate el estreñimiento, facilita la digestión y es resistente al pH gástrico (18,20). Presenta acción antihelmíntica, en ratones infectados con larvas de *Heligmosomoides polygyrus* y en perros con *Ascaris lumbricoides* (18) Se ha descrito que la *papaína* es una de las plantas medicinales más usadas en la prevención de las complicaciones de la Diabetes mellitus como son las complicaciones vasculares, metabólicas, retinopatías, desórdenes digestivos, entre otros. La *papaína* se indica básicamente en la profilaxis y durante el tratamiento del daño causado por toxinas metabólicas en condiciones de degeneración crónica (23). Además, se ha observado que favorece el buen funcionamiento del hígado y páncreas, aunque su mecanismo de acción aún no se ha determinado, se cree que actúa inhibiendo la acción hepatotóxica del tetracloruro de carbono (CCl₄) (25). Otro aporte de la *papaína* en la salud de las personas es que ayuda a disolver tumores cancerosos y linfáticos, hernias discales y formaciones anormales que se producen en las arterias en ciertas formas de arterioesclerosis (18,20).

Así como diversos estudios destacan las excelentes propiedades curativas de esta enzima existen otros estudios que sugieren que la *papaína* del látex podría ocasionar infertilidad ya que reduce la producción espermática en ratas a las cuales se les ha administrado dosis orales de entre 10 y 50 mg/día por 30, 60 y 90 días. Además podría tener efecto abortivo

corto tiempo después de la concepción al dar dosis orales de 20 mg/kg de peso a ratas hembras durante 20 días; en este caso la *papaína*, aparentemente, disuelve las proteínas responsables de la adherencia del huevo fecundado a las paredes del útero (30,31). También, se ha señalado que al administrar dosis de 800 mg/kg peso a ratas hembras a partir del día uno hasta el día diez post-coito se produjeron malformaciones en el feto (33,31). De lo anterior se deduce que la *papaína* en altas dosis podría tener efecto embriotóxico, teratógeno y abortivo. Es de destacar que aparte de estos efectos en la literatura no se reportan otros tipos de efectos nocivos de la *carica papaína*.

2.1b.-Papaína en odontología

Como ya se ha señalado, en el año 1900, Harlan usó *carica papaína* para disolver tejido pulpar, acción que fue nuevamente probada por Hession en 1977 (26).

En 1999 Ferreira et al estudiaron la actividad antimicrobiana de un gel de *papaína* al 0.4% comparándola con aceite de castor al 3.3% e hipoclorito de sodio al 0.5% al irrigar conductos radiculares con diagnóstico de necrosis pulpar y lesión apical evidente. Ellos encontraron que las tres soluciones son eficaces en reducir microorganismos. Sin embargo, el gel de *papaína* fue el menos eficaz de los tres (15,26). Si bien se obtuvieron estos resultados, en

los análisis realizados se pudo comprobar que el gel de *papaína* reduce significativamente el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans*, no así de los anaerobios (15,26), que probablemente había en los conductos radiculares estudiados.

Actualmente la cirujana dentista Sandra Kalil, profesora de la Universidad Metropolitana de Santos, Brasil, utiliza un gel a base de *papaína* “Papacarie”, para adormecer el tejido cariado y poder removerlo por medio de curetaje sin necesidad de anestesia, pues debido a que tiene un pH más básico que la dentina atraviesa los túbulos dentinarios hasta alcanzar las prolongaciones nerviosas presentes en esa región. (27).

A pesar de las numerosas propiedades de esta enzima en diversos problemas de salud, existen muy pocos estudios que avalen su efectividad sobre microorganismos cariogénicos.

2.2.-Sanitrend (biocida orgánico de origen natural)

El creciente interés de parte de los investigadores por estudiar y probar la efectividad de los productos naturales a base de plantas medicinales en los diferentes problemas de salud de la población, ha hecho aparecer en el mercado nuevos productos, es el caso de *Sanitrend*, sanitizante basado en extractos de semillas de cítricos, con poderosa acción bactericida y fungicida

de amplio espectro, biodegradable, no tóxico, no irritante y no corrosivo, según lo avalan estudios de Instituto de Salud Pública. Es un producto categoría GRAS según la FDA. Lo que le permite ser utilizado en una amplia gama de aplicaciones industriales sin ningún riesgo para seres humanos, flora, fauna y el medio ambiente en general (30)

La acción de los componentes activos de *Sanitrend* ha sido estudiada sobre más de 800 especies bacterianas y más de 100 hongos, y dada su alta potencia sólo se requieren bajas concentraciones del producto para lograr los resultados esperados (30).

Sanitrend es un compuesto concentrado de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico) con trazas de ácido ascórbico, derivados cítricos y excipientes. Se presenta como un líquido viscoso, denso y limpio, de color acaramelado con un leve aroma a naranja. *Sanitrend* es un producto soluble en agua, alcohol y glicerina en todas sus proporciones. Sus características naturales y biodegradables lo hacen un producto ideal para ser utilizado en el control rutinario de la contaminación microbiana en diversas áreas. Puede ser utilizado en actividades de sanitización y desinfección de recintos, líneas de producción, maquinarias, utensilios, recipientes, ropa y en general todos los elementos de uso habitual en el proceso productivo. También puede ser utilizado como preservante en la producción de detergentes, pinturas,

adhesivos, etc; así como en la fabricación de todo tipo de recipientes desechables que tendrán contacto eventual con alimentos, agregando al producto una característica de resistencia ante la contaminación con bacterias y hongos (30).

2.2a.-Sanitrend en Odontología

En el ámbito odontológico, no se han reportado estudios que avalen el uso de este biocida orgánico natural, *Sanitrend*, frente a patógenos bucales.

3. ANTECEDENTES SOBRE EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA:

Como muchas otras áreas de la ciencia el campo de los agentes antimicrobianos y el tratamiento de las enfermedades infecciosas, están cambiando continuamente. Nuevos agentes están siendo producidos y probados constantemente para uso humano, al mismo tiempo muchas especies bacterianas son cada vez menos sensibles a dichos agentes.

Hacia fines de los años 50, no existía un procedimiento estandarizado aceptable para los test de sensibilidad. Es así como en el año 1977, en una reunión en Ginebra, integrantes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) expresaron su alarma por el creciente aumento de la resistencia a los

antibióticos en el mundo, causado a menudo por el uso indiscriminado de estos productos. En los últimos años las bacterias resistentes han causado graves brotes de infecciones, por lo que es necesario mantener una estrecha vigilancia utilizando pruebas de sensibilidad fidedignas que proporcionen datos comparables (32). La información microbiológica y epidemiológica disponible ayudaría a los clínicos a seleccionar el agente antimicrobiano más apropiado para cada infección. Para que la predicción fuese válida, la prueba de sensibilidad debería efectuarse mediante un método exacto y reproducible, cuyos resultados pudieran aplicarse directamente a la situación clínica. El criterio definitivo de fiabilidad de cualquier prueba de sensibilidad es su correlación con la respuesta del paciente al tratamiento antimicrobiano (32).

Existe una categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos cuya clasificación está basada en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un antimicrobiano determinado, a los niveles que éste alcanza en la sangre o tejido con la dosificación habitual (33,34). Para ello se debe adoptar una clasificación de tres categorías las cuales deben ser bien interpretadas por los médicos y por el personal del laboratorio debido a su significancia clínica (33,34):

1.- *Sensible*: implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.

2.- *Intermedio*: esta categoría implica cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que las dosis puedan ser aumentadas o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado. También, nos indica una “zona buffer”, que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación.

3.-*Resistente*: son aquellas cepas que no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes los mecanismos específicos de resistencia microbiana, (por ejemplo las Betalactamasas), y la eficacia clínica no ha sido comprobada (33,34).

Los métodos para determinar sensibilidad y resistencia en las bacterias pueden ser *cuantitativos* o *cualitativos*. Los métodos *cuantitativos* determinan la menor concentración de un antibiótico capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo *Concentración Inhibitoria Mínima* (CIM). Los métodos *cualitativos* son aquellos que, empleando la difusión de un antimicrobiano específico concentrado en un disco de papel,

permiten categorizar a los microorganismos en sensibles, intermedios o resistentes (32).

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a agentes antimicrobianos expresada como CIM, se puede ensayar mediante varios métodos. Uno de ellos es la *Técnica de Dilución en Agar*, esta técnica se basa en la preparación de una serie de placas de agar a las cuales se agrega el antimicrobiano a probar en distintas concentraciones incluidas en el medio. Luego cada una de dichas placas se inocula con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (McFarland 0.5). Las placas se examinan después de incubar por 18-24 horas a 35°C se observa si hubo crecimiento bacteriano o ausencia de él y se determina la CIM del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorio cada detalle debe ser controlado cuidadosamente en base a las normas internacionales descritas. Este método ha sido descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) año 2003 (32,34).

Como se mencionó, la *Concentración Inhibitoria Mínima* (CIM) definida como la mínima concentración de un antimicrobiano que inhibe el desarrollo visible de un microorganismo se puede determinar por medio de la técnica de dilución en caldo o en agar. El valor de la CIM orienta al clínico sobre qué

concentración de antimicrobiano necesita alcanzar en el sitio de la infección para inhibir al microorganismo infectante. Sin embargo, no representa un valor absoluto ya que la CIM real puede estar entre la menor concentración del antimicrobiano que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo (32).

En base a los antecedentes presentados en la revisión anterior, en este trabajo se pretende investigar, *in vitro*, el efecto de *papaína* y *Sanitrend* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, aislados a partir de muestras de saliva de pacientes dadores voluntarios del área metropolitana y determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ambos biocidas. Se eligió la técnica de dilución en agar como metodología de trabajo.

Hipótesis:

“*Papaína* al 0.5% y *Sanitrend* a 100 ppm, dos biocidas orgánicos naturales, son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Streptococcus mutans*”

Objetivo General:

- Evaluar *in vitro*, el efecto de *papaína* y *Sanitrend* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* y determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ambos biocidas.

Objetivos Específicos

1. Obtención de aislados clínicos de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de saliva completa de dadores voluntarios chilenos.
2. Identificación morfológica y bioquímica de los aislados de *Streptococcus mutans* obtenidos.
3. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de *papaína* y *Sanitrend* sobre el crecimiento de aislados de *Streptococcus mutans* y de una cepa de referencia ATCC 35668.
4. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la acción antimicrobiana de la *papaína*.

Materiales y Métodos:

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Bucal del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile en conjunto con el laboratorio del Programa de Microbiología-Micología de la Facultad de Medicina de esta misma Universidad

I.-Aislamiento e identificación de cepas chilenas de *Streptococcus mutans*:

la.- Cepas de *Streptococcus mutans* fueron aisladas a partir de muestras de saliva completa de donantes voluntarios chilenos con dentición mixta y permanente del área metropolitana. Las muestras de saliva fueron homogeneizadas en un vortex Mixer (tipo Maximix) por 45 segundos. Luego se tomaron 100µL de saliva y se agregaron a un primer tubo con 900 µL de buffer fosfato pH 7.4. Después de agitar se tomaron 100 µL y se agregaron a un segundo tubo con 900µL de tampón fosfato. Así sucesivamente hasta alcanzar una dilución de 1:10000. 100µL de esta dilución final fueron sembradas en agar TYCSB (Trypticase, L-casitone, Extracto de levadura, Sulfito de sodio, Cloruro de sodio, Fosfato disódico, Acetato de sodio, Sacarosa, agar y bacitracina) medio selectivo para *Streptococcus mutans* (33) y colocadas en una jarra de anaerobiosis con un sobre generador de atmósfera anaeróbica

(Anaerogen Oxoid) para ser cultivadas por 48 horas a 36°C. Como referencia se usó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 proporcionada por el Programa de Microbiología-Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Ib.- La identificación de colonias de *Streptococcus mutans* se realizó en base a la morfología colonial (macroscópica) y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica (Stemi2000C). Luego se realizó el diagnóstico microscópico en base a frotis y tinción de Gram de una muestra de la colonia aislada. A esto se le agregó la prueba bioquímica de la Esculina que permite diferenciar *Streptococcus mutans* (biotipo c,e,f) de *Streptococcus sobrinus*. Esta se realizó a partir de un cultivo de la colonia aislada en caldo Todd Hewitt por 24 horas en anaerobiosis con el fin de tener un cultivo en crecimiento exponencial para obtener un inóculo y sembrarlo en caldo esculina por otras 24 horas. Después de este tiempo se reveló la prueba de la esculina adicionando dos o tres gotas de citrato férrico amoniacal sobre el caldo. La aparición rápida de una coloración negra indica positividad de la prueba y confirma el diagnóstico de *Streptococcus mutans*.

II.-Determinación “in vitro” de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de papaína y Sanitrend mediante el Método de Dilución en Agar:

Para evaluar la acción de *Papaína* y *Sanitrend* sobre cepas de *Streptococcus mutans* en este trabajo se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de ambos compuestos a través de la técnica de dilución en agar, que contempla enfrentar las cepas de *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones de antimicrobiano, *Papaína* y *Sanitrend* en este caso. El agente antimicrobiano se incorpora en el medio de cultivo de manera que cada placa contenga una concentración conocida del antimicrobiano a probar.

Las bacterias fueron sembradas mediante la técnica de inoculación con el uso del replicador de Steer, el cual permite sembrar varias cepas en forma rápida y simultánea en el agar con el antimicrobiano.

a) Preparación de Placas de Agar Mueller-Hinton y TYCS con el antimicrobiano correspondiente (*papaína* o *Sanitrend*) a diferentes concentraciones.

a.1.- Preparación de soluciones de *papaína* y *Sanitrend* de diferentes concentraciones:

Se preparó 10 ml de una solución madre de 2000 mg/ml de *papaína* en agua destilada estéril. Esta fue esterilizada mediante filtración a través de

filtro Millipore de 0.22 μm . La solución fue conservada en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf a -20°C hasta su uso (menos de 30 días).

De igual forma se preparó 100 ml de una solución madre de 500 ppm de *Sanitrend* en agua destilada.

Al momento de usar, a partir de la solución madre de *papaína* se prepararon cuatro diluciones seriadas en un rango que se predeterminó de acuerdo a lo reportado en la literatura: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/ml, correspondientes a 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0%.

A partir de la solución madre de *Sanitrend* se prepararon seis diluciones seriadas en un rango que se predeterminó de acuerdo a lo reportado en la literatura: 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.

a.2.- Preparación de Placas de Agar con los antimicrobianos respectivos:

Agar Mueller-Hinton y TYCS, sin bacitracina, fueron preparados según las indicaciones del fabricante. Después de ser esterilizado por autoclave y, todavía caliente (en forma estéril bajo campana de flujo laminar (Filtro/Met)) se dispensaron 18 ml de medio en tubos tapa rosca estériles, los que fueron mantenidos en baño María a una temperatura de 50°C . Previo a ser dispensado en placa a cada tubo con el agar fundido se agregó 2ml de la dilución de

antimicrobiano correspondiente, previamente preparada. Inmediatamente después el agar fundido con el antimicrobiano incluido se vaciaron en placas de petri estériles.

En el caso del agar Mueller-Hinton se dispensaron 17 ml de medio pues a éste se le adicionó 1 ml de sangre de cordero desfibrinada al 5%, más los 2 ml de la solución de antimicrobiano.

Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y, antes de ser utilizadas se equilibraron a temperatura ambiente evitando la acumulación de gotas de condensación en la etapa.

b) Preparación del inóculo bacteriano que se usará para sembrar las placas de agar con el antimicrobiano incluido:

El inóculo de cada cepa de *Streptococcus mutans* fue preparado suspendiendo colonias puras aisladas en 0.5 ml de suero fisiológico (NaCl 0.15 M) hasta obtener en un densitómetro Biomerieux, una turbidez 0.5 de McFarland. Esta medida equivale a una concentración 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por ml (UFC/ml) (32).

c) Inoculación e incubación de las placas de agar mediante el replicador de Steer:

De cada tubo conteniendo una suspensión bacteriana estandarizada, se tomó con micropipeta una alícuota, la que se distribuyó en el correspondiente pocillo del replicador de Steer. Se confeccionó una plantilla de cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos. El replicador está calibrado para depositar alícuotas de 1-2 μl de cada inóculo sobre la superficie del agar.

Foto 1 (a-d).

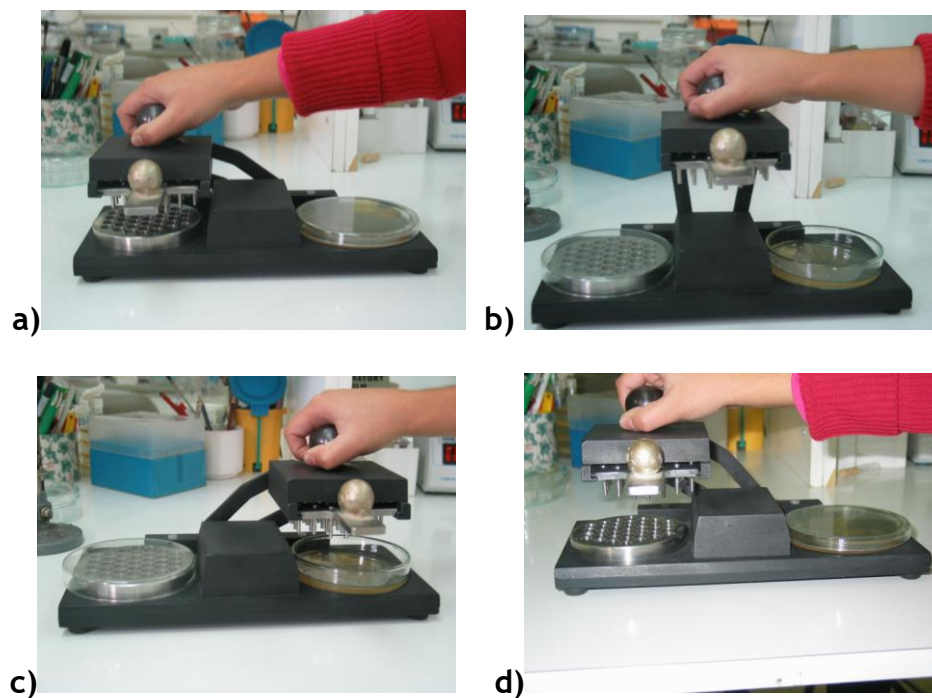


Foto 1: La secuencia de fotografías a-d, muestra el procedimiento de inoculación de las placas de agar conteniendo el antimicrobiano, con los aislados de *Streptococcus mutans*, utilizando el replicador de Steer.

En cada ensayo se inoculó, como control, una placa sin antimicrobiano, al comienzo y al final, para determinar viabilidad (pureza) y detectar posibles contaminaciones durante el procedimiento

Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta secar el inóculo. Luego se incubaron invertidas a 35°C por 48 horas en anaerobiosis (Gas-Pack).

d) Lectura e Interpretación de los Resultados:

Para la interpretación de los resultados obtenidos se utilizó la definición de CIM de acuerdo a las normas NCCLS (34). El valor de CIM se registró como el valor de la menor dilución que inhibía completamente el desarrollo bacteriano. El desarrollo de una colonia o una tenue película causado por el depósito del inóculo se consideró como negativo (32,33.)

III.- Evaluación del efecto del calor sobre la acción antimicrobiana de *papaína*:

Como la *papaína* es una enzima, se sabe que éstas sufren alteraciones en su actividad al ser sometidas a altas temperaturas, por lo que para cerciorarnos de que esto no había influido en nuestros resultados realizamos la prueba conocida como *espotado*, en donde utilizamos una placa de agar TYCS sobre el cual se sembró 100µl de un inóculo bacteriano de la cepa ATCC 35668

de *Streptococcus mutans*, con una turbidez 0.5 de McFarland, acto seguido, se depositó sobre el prado sembrado alícuotas de 15µl de cada una de las diferentes concentraciones de *papaína* utilizadas en el estudio. La placa se colocó en jarra de anaerobiosis con un sobre generador de atmósfera anaeróbica por 48 horas a 36°C.

Resultados y análisis de resultados:

1.- Aislamiento e identificación de colonias de *Streptococcus mutans* :

A partir del cultivo y aislamiento bacteriano desde muestras de saliva total en agar TYCSB se obtuvieron colonias aisladas con características macroscópicas correspondientes a *Streptococcus mutans* descritas en la tabla II. A cada una se le identificó con un número y la inicial del paciente donante.

Tabla II: Características macroscópicas de las colonias bacterianas aisladas.

Cepas de <i>S. mutans</i>	Morfología colonial	Adherencia Colonial	Test Esculina
ATCC-1, GM-3, MA-7, PB-9, JE-10, S-11, S-14, S-15, S-16, S-17, S-18, S-19, B-20, B-21, CA-22, MG-25, LL-28, IA-31, OM-32, OM-33, C-43, C-45, 50 J-48, CR-51, CR-52	Pequeñas, cristalinas, superficie rugosa.	+++	+
S-13, OM-34, OM-35, IU-36, V-38, CM-39, C-40	Medianas, cristalinas, superficie rugosa.	+++	+
CR-63, CR-64, S-77	Pequeñas, aspecto azucarado, superficie rugosa.	+++	+
XX-46, XX-47, CR-53, CR-54, DG-58, C-59	Medianas, aspecto azucarado, superficie rugosa.	+++	+
J-49, CR-50, CC-72	Grandes, aspecto azucarado, superficie rugosa.	+++	+
CR-55, YI-56, AM-57, CR-60, CR-61, CR-62, CR-65, DG-70, MA-75, MA-76	Pequeñas, cristalinas, superficie lisa.	+++	+
GM-2, MA-8, S-12, VM-24, LL-29, XX-44, CR-66, CR-67, MF-68, MC-69, GM-71, AM-78	Medianas, cristalinas, superficie lisa.	+++	+
OM-4, J-5, J-6, AM-27, MC-30, J-73 J-74	Grandes, cristalinas, superficie lisa.	+++	+

+++ : Colonias muy adherentes; + : Positivo para hidrólisis de esculina

De acuerdo a las características morfológicas encontradas las colonias aisladas se agruparon en ocho categorías, siendo la más predominante aquellas colonias pequeñas, cristalinas de superficie rugosa. Todas las colonias presentaron una fuerte adherencia al agar. Las fotos 2-6 muestran las diferentes morfologías mencionadas:

Foto 2. Colonias obtenidas en TYCSB a partir de muestras de saliva. Se observan algunas colonias de aspecto transparente, superficie irregular y de bordes rugosos, características que corresponden a colonias de *Streptococcus mutans* (flechas).

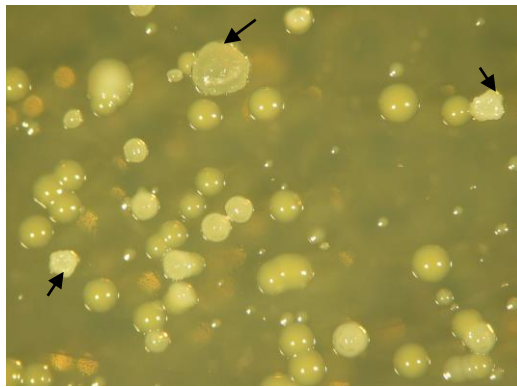


Foto 3. Colonia de *Streptococcus mutans*. Se observa el aspecto cristalino, la superficie irregular y los bordes rugosos. Alrededor de la colonia se ven algunas gotitas de líquido que corresponde al dextrán producido por *Streptococcus mutans*.

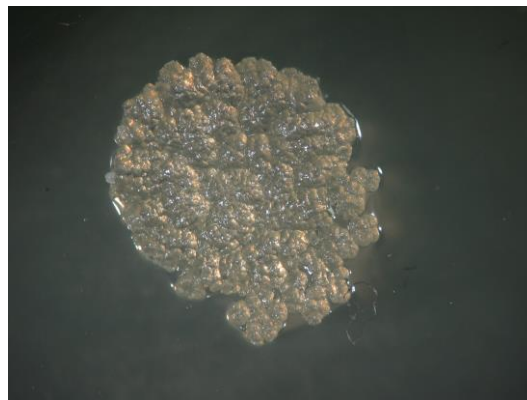


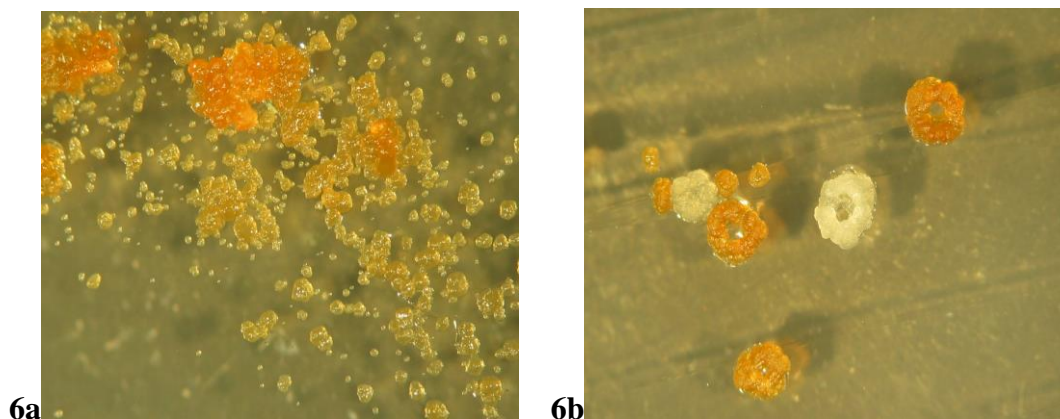
Foto 4. Colonia de *Streptococcus mutans*. Se observa el aspecto azucarado, la superficie irregular y los bordes rugosos. Alrededor de la colonia se ven algunas gotitas de líquido que corresponde al dextrán producido por *Streptococcus mutans*.



Foto 5. Colonia de *Streptococcus mutans*. Se observa el aspecto cristalino y la superficie lisa. Alrededor de la colonia se ven algunas gotitas de líquido que corresponde al dextrán producido por *Streptococcus mutans*.



Foto 6 (a-b): Colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Se aprecian colonias cristalinas y de superficie irregular. Nótese el color amarillo-anaranjado de las colonias correspondientes a esta cepa bacteriana.



El frotis de todas las colonias teñido con Gram mostró formas cocáceas, Gram positivas y dispuestos en cadenas típicas de *Streptococcus mutans*. Foto 7(a-b)

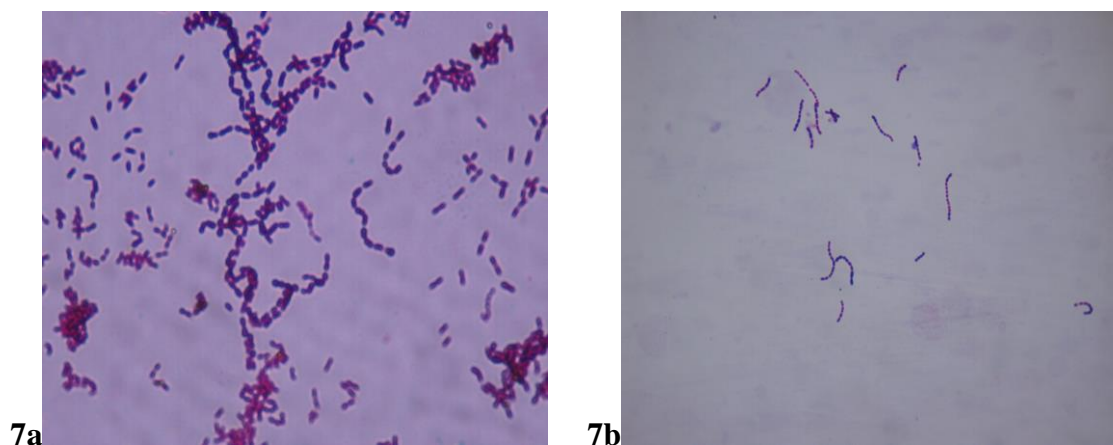


Foto7 (a-b): Tinción Gram efectuada a colonias de *Streptococcus mutans* obtenidas desde muestras de saliva. Se observan formas cocáceas Gram (+), dispuestas en cadena

El test bioquímico de la esculina permitió definir los aislados positivos para esta prueba, resultado característico de *Streptococcus mutans*. Estos aislados fueron seleccionados para el estudio posterior. Tabla II y foto 8

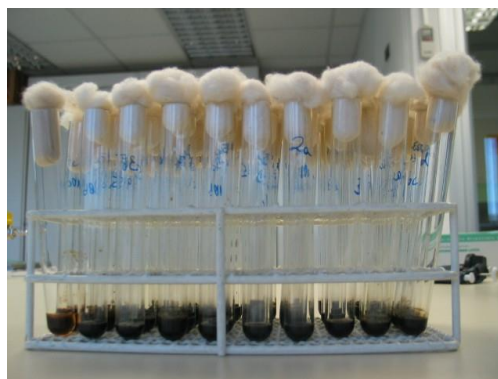


Foto 8: Prueba de hidrólisis de esculina: La aparición rápida de una coloración negra indicó positividad de la prueba y confirmó el diagnóstico de *Streptococcus mutans*

2.- Determinación “in vitro” de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de papaína y Sanitrend mediante el Método de Dilución en Agar:

2.1a.- Ensayo de CIM para *papaína* realizado en agar Mueller-Hinton. En un primer ensayo se incluyeron 36 aislados de *Streptococcus mutans* (2, 3, 5-8, 10-21, 30, 32, 35, 36, 38, 48, 68-78), los que fueron expuestos a las cuatro siguientes diluciones de papaína de 2mg/ml, 4mg/ml, 8mg/ml y 16mg/ml, correspondientes a 0.2%, 0.4%, 0.8% y 1.6% respectivamente. Sin embargo, ninguna de estas diluciones fue suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano de los aislados probados, de los cuales 21 dieron crecimiento positivo.

2.1b.- **Ensayo de CIM para *Sanitrend* realizado en agar Mueller-Hinton.** En un primer ensayo se incluyeron 36 aislados de *Streptococcus mutans*, los que fueron expuestos a las seis siguientes diluciones de *Sanitrend*: 50ppm, 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm y 500ppm. Se puede observar que la inhibición del crecimiento bacteriano de parte del biocida, comienza a manifestarse a partir de una concentración de 50ppm siendo completamente inhibido el crecimiento de *Streptococcus mutans* con una concentración de 200ppm como se muestra en la tabla III.

Tabla III: Crecimiento de *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones de *Sanitrend* en agar Mueller-Hinton

Cepas <i>S.mutans</i>	Concentraciones de <i>Sanitrend</i> (ppm)							Control 2
	Control 1	50	100	200	300	400	500	
GM-2	+	+	+	-	-	-	-	+
GM-3	+	+	+	-	-	-	-	+
J-5	+	-	-	-	-	-	-	+
J-6	+	+	-	-	-	-	-	+
MA-7	+	+	+	-	-	-	-	+
MA-8	+	-	-	-	-	-	-	+
JE-10	+	+	+	-	-	-	-	+
S-11	+	-	-	-	-	-	-	+
S-12	+	+	+	-	-	-	-	+
S-13	+	+	-	-	-	-	-	+
S-14	+	-	-	-	-	-	-	+
S-15	+	+	+	-	-	-	-	+
S-16	+	+	-	-	-	-	-	+
S-17	+	-	-	-	-	-	-	+
S-18	+	+	+	-	-	-	-	+
S-19	+	+	-	-	-	-	-	+
B-20	+	+	+	-	-	-	-	+
B-21	+	+	-	-	-	-	-	+
OM-35	+	-	-	-	-	-	-	+
GM-71	+	+	+	-	-	-	-	+
J-73	+	+	-	-	-	-	-	+
ATCC	+	+	-	-	-	-	-	+

+: Indica que hubo crecimiento bacteriano colonia

-: indica ausencia de crecimiento o hallazgo de 1

Como se aprecia en la Tabla III el crecimiento de 6 cepas bacterianas fue inhibido a una concentración de 50ppm por lo que ésta correspondería a su CIM; para 7 cepas su CIM correspondería a una concentración de 100ppm; y para las 9 cepas restantes la CIM corresponde a 200ppm. Tabla IV

Tabla IV: CIM de *Sanitrend* para cepas de *Streptococcus mutans* en agar Mueller-Hinton

Número de cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	CIM (ppm)
6	50
7	100
9	200

De acuerdo a los resultados obtenidos la CIM30 de Sanitrend para cepas de *Streptococcus mutans* en agar Mueller-Hinton es de 50ppm, la CIM50 corresponde a 100ppm y CIM90 a 200ppm.

2.2a .- Ensayo de CIM para papaína realizado en agar TYCS. En este ensayo se usó agar TYCS (sin bacitracina) en lugar del agar Mueller-Hinton, por ser este medio el que otorga las mejores condiciones para el crecimiento óptimo de *Streptococcus mutans*. Se incluyeron 67 aislados bacterianos los que fueron sembrados en placas con diferentes concentraciones de papaína. En todos los

ensayos se incluyó una placa sin biocida como control inicial y final de la siembra con el replicador, todos los cuales dieron crecimiento positivo. Los aislados que no crecieron en estas placas control fueron excluidos de los ensayos (en este caso se consideraron 51 aislados). Los resultados obtenidos se exponen en la tabla V y foto 9.

Tabla V: Crecimiento de 51 cepas de *Streptococcus mutans* a distintas concentraciones de *papaína*

% de aislados bacterianos con crecimiento	Concentraciones de papaína (g/ml)					
	Control 1 sin biocida	0.5	1.0	1.5	2.0	Control 2 sin biocida
100	+	+	+	+	+	+

+: crecimiento bacteriano

Como se puede apreciar en la Tabla V no se pudo determinar la CIM de *papaína* frente a ninguna de las 51 cepas de *Streptococcus mutans*, pues hubo crecimiento en todas las concentraciones probadas. Foto 9.

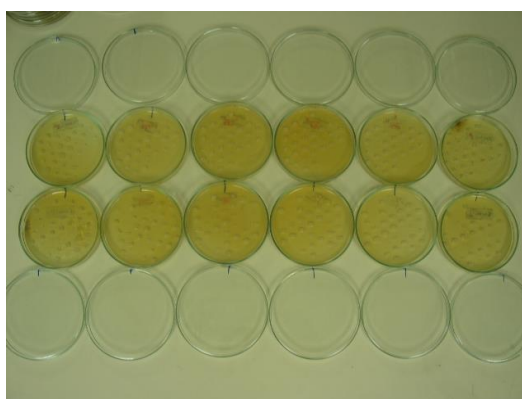


Foto 9 Ensayo para papaína en agar TYCS: se observa crecimiento de *Streptococcus mutans* en todas las concentraciones de biocida utilizadas.

Sin embargo, en la Tabla VI se puede observar que a mayor concentración de *papaína* el crecimiento colonial de *Streptococcus mutans* se reduce pero no se inhibe, aumentando la cantidad de aislados con crecimiento menor que confluyente y reducido. Esto se aprecia mejor en el gráfico 1 y foto 10 (a-e)

Tabla VI: Porcentaje de cepas de *Streptococcus mutans* bajo las diferentes categorías de crecimiento (confluyente, semi-confluyente, reducido y con 2 a 5 colonias) en agar TYCS con distintas concentraciones de *Papaína* (g/ml).

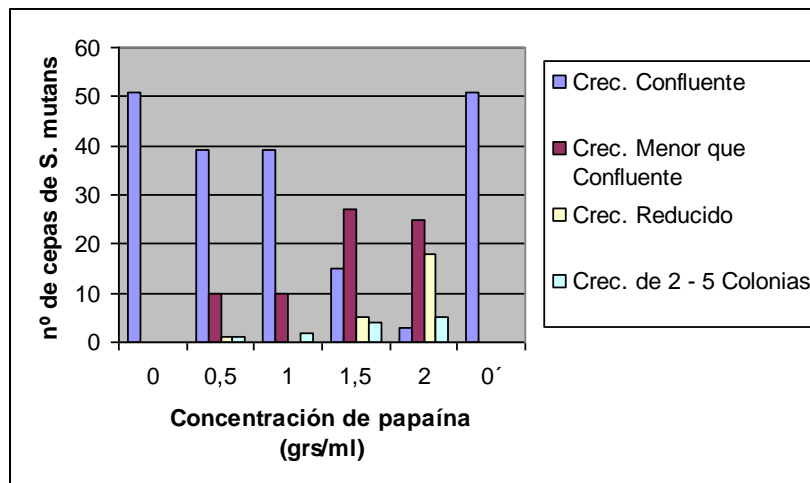
% de aislados con crecimiento	Concentraciones de <i>papaína</i> (g/ml)					Control 2 Sin biocida
	Control 1 Sin biocida	0.5	1.0	1.5	2.0	
Confluyente	100	76.5	76.5	29.41	5.90	100
Menor que confluyente	0	19.6	19.6	52.94	49.02	0
Reducido	0	1.96	0	9.80	35.30	0
2-5 colonias	0	1.96	3.62	7.84	9.08	0
Sin crecimiento (1 o ninguna colonia)	0	0	0	0	0	0

Confluyente = crecimiento bacteriano en toda la superficie del depósito del inóculo inóculo.

Menor que confluyente = no toda la superficie del inóculo está cubierta por colonias bacterianas.

Reducido = crecimiento de más de 5 colonias en la superficie del inóculo.

Gráfico 1: Efecto de las distintas concentraciones de *papaína* sobre el patrón de crecimiento de los aislados de *Streptococcus mutans*



La siguiente secuencia muestra el efecto sobre el crecimiento del aislado S-15 de *Streptococcus mutans* de papaína a medida que aumenta su concentración en las distintas concentraciones de *papaína*: Foto 10 (a-e)

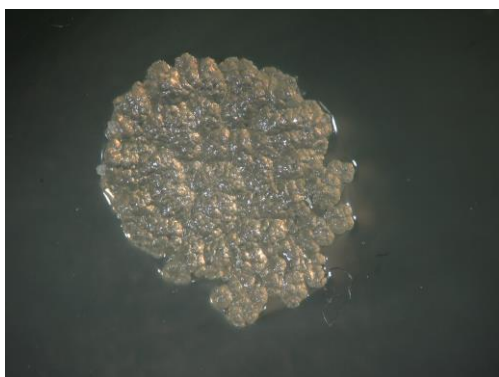


Foto 10a: aislado S-15 crecido en placa control 1 sin biocida.



Foto 10b: aislado S-15 crecido en placa a una concentración 0.5% de *papaína*.

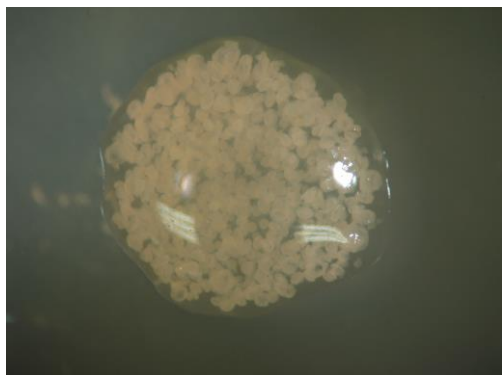


Foto 10c: aislado S-15 crecido en placa a una concentración 1.0% de *papaína*

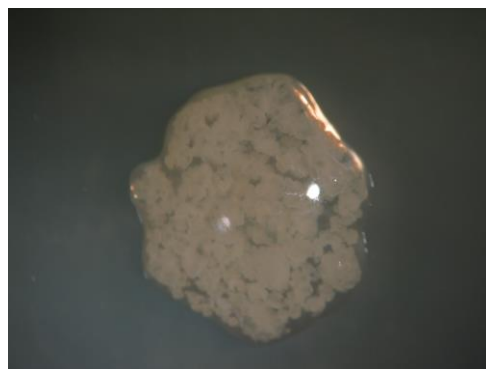


Foto 10d: aislado S-15 crecido en placa a una concentración de 1.5%

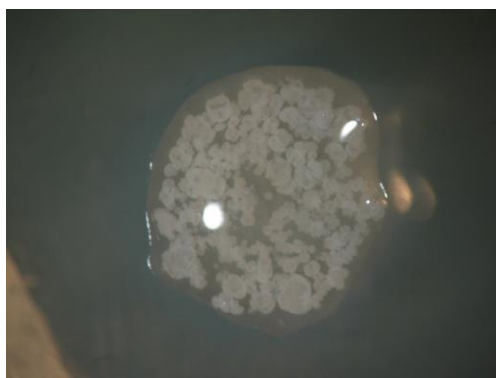


Foto 10e: aislado S-15 crecido en placa a una concentración 2.0% de *papaína*

Como se observa, al mismo tiempo que se reduce el crecimiento de *Streptococcus mutans*, al aumentar la concentración de biocida cambia la morfología colonial apareciendo una película transparente que envuelve la colonia bacteriana como si fuese una cápsula. Al realizar frotis con tinción de Gram de este aislado se observó que las células sometidas a mayores concentraciones de *papaína* se comportan como Gram negativo, revelando

algún efecto de la *papaína* sobre las estructuras externas de *Streptococcus mutans*.

La cepa de referencia ATCC 35668 mostró la misma tendencia descrita para los aislados clínicos probados en este estudio, lo que permite validar nuestros resultados.

2.2a.1 Evaluación del efecto del calor sobre la acción antimicrobiana de la *papaína*: con el análisis de la prueba del *espoteado* se comprobó que los resultados obtenidos en los ensayos anteriores no habían sido influenciados por la temperatura de preparación del medio de cultivo.

2.2b .- Ensayo de CIM para *Sanitrend* realizado en agar TYCS: tal como se realizó el ensayo con *papaína* fue llevada a cabo la prueba con *Sanitrend*. Se incluyeron 51 aislados bacterianos los que fueron sembrados en placas con diferentes concentraciones de *Sanitrend*. En todos los ensayos se incluyó una placa sin biocida como control inicial y final de la siembra con el replicador, todos los cuales dieron crecimiento positivo. Los resultados obtenidos se presentan a continuación. Tabla VII y foto 11:

Tabla VII: Crecimiento de *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones de Sanitrend en agar TYCS

Cepas <i>S.mutans</i>	Concentración Sanitrend (ppm)							Control 2
	Control 1	50	100	200	300	400	500	
ATCC-1	+	-	-	-	-	-	-	+
GM-3	+	+	-	-	-	-	-	+
MA-7	+	-	-	-	-	-	-	+
PB-9	+	-	-	-	-	-	-	+
S-11	+	+	-	-	-	-	-	+
S-12	+	-	-	-	-	-	-	+
S-13	+	-	-	-	-	-	-	+
S-14	+	-	-	-	-	-	-	+
S-15	+	-	-	-	-	-	-	+
S-16	+	-	-	-	-	-	-	+
S-17	+	-	-	-	-	-	-	+
S-18	+	-	-	-	-	-	-	+
S-19	+	-	-	-	-	-	-	+
B-20	+	-	-	-	-	-	-	+
B-21	+	-	-	-	-	-	-	+
MG-25	+	+	-	-	-	-	-	+
AM-27	+	-	-	-	-	-	-	+
LL-28	+	-	-	-	-	-	-	+
LL-29	+	-	-	-	-	-	-	+
MC-30	+	-	-	-	-	-	-	+
IA-31	+	-	-	-	-	-	-	+
OM-32	+	-	-	-	-	-	-	+
OM-33	+	-	-	-	-	-	-	+
OM-34	+	-	-	-	-	-	-	+
IU-36	+	-	-	-	-	-	-	+
C_40	+	-	-	-	-	-	-	+
XX-44	+	-	-	-	-	-	-	+
XX-46	+	+	-	-	-	-	-	+
XX-47	+	-	-	-	-	-	-	+
CR-51	+	-	-	-	-	-	-	+
J-48	+	-	-	-	-	-	-	+
YI-56	+	-	-	-	-	-	-	+
AM-57	+	+	-	-	-	-	-	+
C-59	+	-	-	-	-	-	-	+
CR-60	+	-	-	-	-	-	-	+
CR-62	+	+	-	-	-	-	-	+
CR-63	+	-	-	-	-	-	-	+
CR-65	+	-	-	-	-	-	-	+
CR-66	+	-	-	-	-	-	-	+
CR-67	+	-	-	-	-	-	-	+
MF-68	+	-	-	-	-	-	-	+
MC-69	+	-	-	-	-	-	-	+
DG-70	+	-	-	-	-	-	-	+
GM-71	+	-	-	-	-	-	-	+
CC-72	+	-	-	-	-	-	-	+
J-73	+	-	-	-	-	-	-	+
J-74	+	-	-	-	-	-	-	+
MA-75	+	-	-	-	-	-	-	+
MA-76	+	-	-	-	-	-	-	+
S-77	+	-	-	-	-	-	-	+
AM-78	+	-	-	-	-	-	-	+

+ : indica que hubo crecimiento bacteriano

--: indica ausencia de crecimiento o hallazgo de 1 colonia

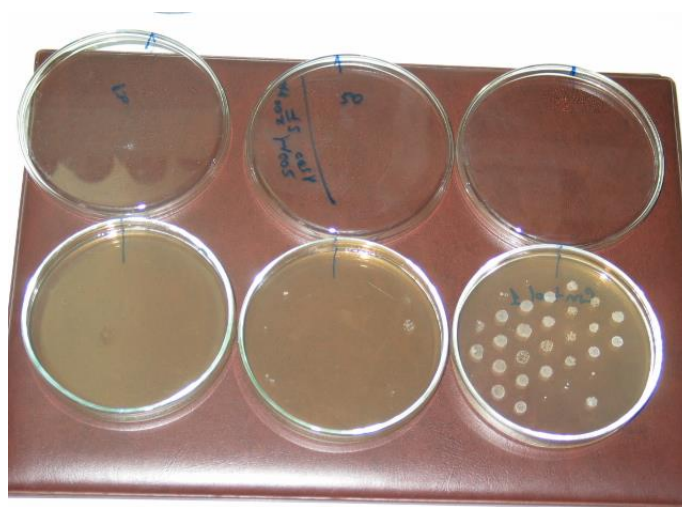


Foto 11: Inhibición del crecimiento bacteriano por *Sanitrend*, placa control a la derecha muestra desarrollo de todas las cepas incluidas en el ensayo, al centro se aprecia crecimiento bacteriano de 6 cepas a una concentración de *Sanitrend* de 50ppm, a la izquierda se aprecia completa inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* a una concentración de 100ppm de *Sanitrend*.

Como se aprecia en la Tabla VII y foto 11 el crecimiento de 45 cepas bacterianas fue inhibido a una concentración de 50ppm por lo que ésta correspondería a su CIM; para las 6 restantes cepas su CIM correspondería a una concentración de 100ppm. Tabla VIII

Tabla VIII: CIM de *Sanitrend* para cepas de *Streptococcus mutans* en agar TYCS

Número de cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	CIM (ppm)
45	50
6	100

De acuerdo a los resultados obtenidos la CIM50 de *Sanitrend* para cepas de *Streptococcus mutans* en agar TYCS es de 50ppm y la CIM90 corresponde a 100ppm.

Discusión

Streptococcus mutans ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental y es por esto que numerosas investigaciones se han destinado al estudio de sustancias que impidan que el agente patógeno prolifere en el medio bucal o controlen su crecimiento.

El aislamiento de cepas de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de saliva completa de pacientes, dadores voluntarios del área metropolitana, en agar TYCSB, permitió obtener colonias cuya caracterización microscópica mostró formas cocáceas, Gram positivas, dispuestas en cadena y positivas para el test bioquímico de la esculina, propias de *Streptococcus mutans*. Estas colonias mostraron diferentes características macroscópicas, tanto en tamaño como en aspecto, lo que sugiere que existen variantes con posible base genética dentro de la misma especie, lo cual propicia mayor investigación en este aspecto a futuro.

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los antimicrobianos se puede ensayar mediante varios métodos disponibles en el laboratorio, uno de ellos es la técnica de dilución en agar, la cual permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El valor de CIM obtenido por este método, orienta al clínico sobre qué concentración de biocida necesita alcanzar en el sitio de la infección para inhibir al microorganismo infectante.

En este estudio se utilizó la técnica de dilución en agar para determinar la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Streptococcus mutans* frente a distintas concentraciones de *papaína* y *Sanitrend*.

Los ensayos para determinar la CIM de *papaína*, tanto en agar Mueller-Hinton como en agar TYCS, mostraron que el crecimiento bacteriano disminuye pero no se inhibe a medida que aumenta la concentración del biocida. Esto hace pensar que si siguiéramos aumentando la cantidad de *papaína* en el medio, en algún momento podríamos alcanzar “*in vitro*” tal inhibición y así podríamos determinar la CIM de esta sustancia frente al crecimiento de *Streptococcus mutans*. Sin embargo, esta concentración sería clínicamente imposible de utilizar, pues siendo la *papaína* una enzima proteolítica (es decir, digiere las proteínas) se aumenta el riesgo de dañar la mucosa bucal y el resto de los tejidos blandos que rodean al diente.

Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con lo reportado por Ferreira et al, quién señala que una solución de *papaína* al 0,4% reduce de manera significativa la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* “in vivo”. En nuestro caso comenzamos a apreciar una leve reducción del crecimiento de esta bacteria al utilizar concentraciones al 1% y 1,5% de *papaína*, la que se hizo más evidente a una concentración del 2.0% de este biocida. Tal diferencia puede deberse, como se ha reportado en literatura para muchos productos naturales, tales como el propóleo y el extracto de semillas de uva, a que las propiedades medicinales de la *papaína* estarían influenciadas de acuerdo al área geográfica en donde se desarrolla el fruto, la flora y fauna circundante, la edad y el sexo del árbol del cual se extrae el producto. En este trabajo se usó *papaína* comercial (Merck) y la utilizada por Ferreira et al. en su trabajo es de origen brasileño.

Si bien es cierto, que la *papaína* no podría ser utilizada con fines terapéuticos en el ámbito odontológico, un hallazgo interesante de este estudio, respecto a su acción, fue la alteración de la morfología colonial de *Streptococcus mutans*. Las colonias, al ser crecidas en agar TYCS, aparecían con aspecto de poseer una envoltura transparente que las cubría lo que se hizo más evidente al aumentar la concentración del biocida. Al observar estas colonias bajo lupa, se evidenciaron pequeños grumos dispersos dentro de la

envoltura transparente que la rodeaba, al realizar frotis y tinción de Gram se vieron como formas cocáceas en cadena de color rosado. Esto podría deberse a que la *papaína*, al ser una enzima proteolítica, modificaría la estructura de la membrana celular de *Streptococcus mutans*, sugiriendo una alteración de la estructura de pared de esta bacteria, probablemente a nivel de sus componentes peptídico. Dichas observaciones no han sido reportadas en la literatura por lo que amerita mayor investigación.

Los ensayos realizados con distintas concentraciones de Sanitrend, tanto en agar Mueller-Hinton como en agar TYCS, dejaron de manifiesto la poderosa acción antibacteriana de este biocida orgánico natural, ya que con el uso de bajas concentraciones se logró inhibir completamente el crecimiento de todas las cepas de *Streptococcus mutans* en estudio permitiendo, en ambos casos, determinar la CIM de este antimicrobiano frente al microorganismo causante de la caries dental la que fue de 200ppm en el caso del agar Mueller-Hinton y 100ppm en el caso del agar TYCS. Esta diferencia podría deberse a que este último medio de cultivo reuniría las condiciones necesarias para el cocimiento y desarrollo óptimo de este microorganismo. Sin embargo, el agar Mueller-Hinton es el medio estandarizado para la técnica de dilución en agar.

La cepa de referencia ATCC 35668 mostró la misma tendencia descrita para los aislados clínicos probados en este estudio, lo cual permite validar nuestros resultados.

Conclusiones

De acuerdo a lo reportado en este trabajo de investigación, cuyo objetivo fue evaluar el efecto y la actividad antimicrobiana de *papaína* y *Sanitrend* frente a cepas de *Streptococcus mutans*, a través de la determinación *in vitro* de la CIM por el método de dilución en agar, podemos concluir lo siguiente:

1. La siembra, en agar TYCS, de 100µl de diluciones 1:10000 en buffer fosfato de muestras de saliva, permitió obtener colonias aisladas de *Streptococcus mutans*.
2. La identificación de cepas de *Streptococcus mutans*, de acuerdo a sus características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas, dejó de manifiesto que existen variantes, con probable base genética, dentro de la misma especie, lo cual que amerita mayor investigación.
3. La mayor concentración de *papaína* (2.0%) usada en este estudio, no fue suficiente para inhibir completamente el crecimiento de

Streptococcus mutans, sin embargo, sí se logró reducir dicho crecimiento. En base a lo anterior, cabe esperar que concentraciones mayores que 2.0% logren la completa inhibición, pero éstas no serían factibles de utilizar clínicamente.

4. El uso de diferentes concentraciones de *papaína*, probablemente provocó variaciones a nivel de las estructuras externas de *Streptococcus mutans*, lo que se evidenció al observar que sus características macro y microscópicas se habían alterado. Este efecto se hizo más notorio al aumentar dichas concentraciones.
5. Al espotear *papaína* sobre el agar recién sembrado, no se obtuvo diferencias en el crecimiento de *Streptococcus mutans* con respecto a lo observado al incluir esta enzima en el medio de cultivo, indicando que la temperatura no tuvo efecto adverso sobre su actividad.
6. Bajas concentraciones de *Sanitrend* (50, 100, 200, 300, 400 y 500ppm) son suficientes para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*.
7. La CIM de *Sanitrend* frente a cepas de *Streptococcus mutans* en agar TYCS fue de 100ppm.
8. La cepa de referencia ATCC 35668 mostró la misma tendencia descrita para los aislados clínicos en los ensayos realizados tanto con *papaína* como con *Sanitrend*.

9. los fármacos a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos, pues en ellos los principios activos están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí, de tal forma que no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados.

Sugerencia:

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere un estudio, *in vivo*, del efecto de *Sanitrend* sobre el recuento salival de *Streptococcus mutans*.

Resumen

Streptococcus mutans ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental, la cual es considerada una de las enfermedades infecciosas más comunes en los seres humanos. Por esto, muchas investigaciones están destinadas al estudio de sustancias, tanto químicas como de origen natural, que impidan que el agente patógeno proliferen en el medio bucal. Dentro de las sustancias de origen natural tenemos *papaína* y *Sanitrend*. *Papaína* es una enzima proveniente de la papaya, la cual además de facilitar la digestión, presenta propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antifúngicas. *Sanitrend* es un biocida orgánico natural basado en extractos de semillas de cítricos, presenta acción antimicrobiana y fungicida de amplio espectro. En el estudio de sustancias con propiedades antibacterianas se puede utilizar la técnica de dilución en agar, en la cual se prepara una serie de placas con agar a las que se les agrega el antimicrobiano a diferentes concentraciones, luego se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan luego de incubar 48 hrs a 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo. **Objetivo:** Evaluar *in vitro*, el efecto de *papaína* y *Sanitrend* sobre el crecimiento de *Streptococcus*

mutans y determinar la CIM de ambos biocidas. **Resultados:** la mayor concentración de *papaína* (2.0%), usada en este estudio, no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, sin embargo, sí lo reduce. Bajas concentraciones de *Sanitrend* lograron inhibir completamente el crecimiento de este microorganismo.

Referencias bibliográficas

1. Sturdevant. C, Roberson .T and H.Heymann. “Operatoria Dental Arte y Ciencia”. 3ª Ed. 1996 pp 223-28.
2. Menaker. L, Horhart .R y J.Navia. “Bases Biológicas de la Caries Dental”. Ed. Salvat 1986 pp 60-88.
3. Urzúa. I y Stanke. F. “Nuevas Estrategias en Cariología: Factores de Riesgo y Tratamiento”. 1999 pp 13-30; 39-45; 50-52; 59-61.
4. Huerta J. “Principios de Microbiología Bucal”. Ed. De la Universidad de Chile. 1975. pp 23-33; 35-36; 42-45; 55-58.
5. Yoshida A, Suzuki N, Nakaro Y, Kawada M, Oho T and k. Toshihiko.”Development of a 5´nuclease-based real-time PCR assayfor quantitative detection of cariogenic dental pathogen Streptococcus mutans” J of Clin. Microbiol.2003; 41(9):4438-4441
6. Bowen W.H. “Wither or wither caries research?” Caries Res. 1999; 33: 1-3.
7. Revista Cubana de Odontología.
[http:// www.guiapRACTICADEESTOMATOLOGIA.com](http://www.guiapRACTICADEESTOMATOLOGIA.com).

8. Linossier. A, Pizarro. E, Donoso. E y B. Charim “Estimación del Riesgo a Caries Dental en Escolares a través de Evaluación Clínica, Microbiológicas y Radiográficas”. [http:// www.google.com](http://www.google.com).
9. Cretchley. P. “The Breakdown of the Carbohydrate and Protein matrix of the Dental plaque”. *Caries Res.*1969.3:249- 265.
10. Loeshe.W.J.” Rol of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay”. *Microbiol. Rev.* 1986. 50: 353- 380.
11. Coelho. J, Kohut. B, Mankodi. S, Parikh. R, and M.M Wu. “Essencial Oils in an Antiplaque and Antigingivitis dentifrice: A6- month Study” *Am J Dent.* 2000; 13; 5C-10C.
12. Lucas. G.Q and O.N. Lucas “Preventive Action of Short Term and Long Term Chlorhexidine Rinses” *Acta Odont. Latinoamer.* 1999. 12: 45-48.
13. Venkitaraman. A. R, Vacca-Smith. A.M, Kopec. L.K. and W.H. Bomen.” Characterization of GlucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in Solution and on the Surface of Hydroxyapatite”. *J Dent. Res.* 1995. 74: 1695-1701
14. Read. P, Stanke. F, Arraigada. M. “Efecto Antimicrobiano de la Solución de Dakin (Solución de Hipoclorito de Sodio de 0.05%) en Cavidades de Operatoria: Estudio *in vivo*. Tesis para optar al título de Cirujano

Dentista de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 2001.pp 5-7

15. Rodrigues. C.” Eficacia Antimicrobiana de Soluções Irrigadas de Canais Radiculares” Dissertação apresentada ao Programa de Maestrado en Medicina Tropical de Universidad Federal de Goiás. 2000.pp 27.
16. Ballestrello. P.“Introducción a la Fitoterapia”. Universidad Católica de Chile. pp1.
17. Fitoterapia.[file :// A:\.fitoterapia.htm](file:///A:\.fitoterapia.htm)
18. Treating Livestock with Medicinal Plant: Beneficial or Toxic? .<http://www.guiaverde.com/arboles/caricapapaya.htm>.
19. Robles A.K. “La Papaya (Carica papaya). Species Plantarum. 2001. 2: 1036- 1043.
20. Rincón Sibarita:La Fruta de la Vida.
<http://www.guiaverde.com/arboles/caricapapaya.htm>.
21. Udod. V.M, Storozhuk.V.T, Trofimenko. S.P, Shabash. E.G, and S.I. Markelov. “Effect of the proteolytic enzyme papain on the body organs and systems of experimental animals” Farmakol Toksikol. 1983. 46: 95-98.
22. Otuka .E.S, Pedrazzani.E.S, and M.P Pioto. “The Use of Papain in Plantar Ulcers” Rev. Bras. Enferm. 1996. 49: 207-214.

23. Savickiene. N, Dagilyte.A, Lukosius. A, and V. Zitkevicius. "Importance of Biologically Active Components and Plants in the Prevention of Complication of Diabetes Mellitus". *Medicina (Kaunas)*. 2002; 38: 970-975.
24. Dawkins.G, Hewitt. H, Wint.Y, Obiefuna.P.C and B. Wint. "Antibacterial Effects of Carica Papaya Fruit on Common Wound Organisms". *West Indian Med J*. 2003; 52: 290-292.
25. Balasubramanian R, Balasundaram. J, Subramanian.K. and M. Narayanan. "Effects of Dried Fruits of Carica Papaya Linn on Hepatotoxicity". *Biol. Pharm. Bull.*2002; 25: 1645- 1646.
26. Ferreira. C, Bonifacio. K, Froner. I, and I.Ito. "Evaluation of the Antimicrobial Activity of three Irrigating Solutions in teeth with Pulpal Necrosis". *Braz. Dent J*. 1999; 10: 1-6.
27. "Produto Nacional à base de Papaína Remove Cárias sem uso da Broca <http://www.dialogoiberoamericano.com>.
28. Oderinde. O, Noronha. C. Oremosu. A, Kusemiju T and O.A. Okanlawon. "Abortifacient Properties of Aqueous Extract of Carica Papaya (Linn)Seed on Female Sprague-Dawley Rats". *Niger Postgrad Med J*.2002 Jun; 9(2): 95-8

29. Cherian. T.” Effect of Papaya Latex Extract on Gravid and Non-Gravid Rat Uterine Preparations In Vitro”. J Ethnopharmacol.2000 Jun; 70(3): 205-12.
30. Fuente: Fabricante AC IND&COM LTDA. de Brasil
31. Van Palestein. W. H, Ijsseldijk. M. and J.H.J Huis in ‘T Veld. “A Selective Medium for the Two Major Subgroups of the Bacterium *Streptococcus mutans* Isolated from Human Dental Plaque and Saliva”. Archs oral Biol. 1983; 28: 599- 603.
32. Galas .M, Corso. A, Pasterán. F. y P. Ceriana.” XVII Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos”. 2003. pp 9, 11, 76, 95- 104.
33. Rodríguez. C.M, “Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos” www.google.com
34. Cona T, Erna.”Condiciones para un Buen Estudio de Susceptibilidad Mediante Test de Difusión en Agar”Rev.Chil.Infectol, 2002;19 supl 2, pp 77-81. ISSN0716-1018.
35. Misengard y Newman “Oral Microbiology and Immunology” 2ª Ed. 1996 pp 342.

