



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO
ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DEL
EXTRACTO METANÓLICO *Dracontium lorentense*
(JERGÓN SACHA) SOBRE CEPAS DE *Candida albicans*
(ATCC®10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™)
y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™)**

TESIS

Para optar el título profesional de: Cirujano dentista

AUTOR

Manrique Holguín, Paola Cecibel (0000-0001-8210-6922)

ASESOR DE TESIS

Dra. Juana Mercedes del Valle Mendoza (0000-0002-6011-5040)

Lima, 14 de Diciembre del 2017

DEDICATORIA

*Con mucho amor a mis padres Javier y Rosa por todo el amor, esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado durante todos estos años de estudio.
A mi hermano Harold por el gran apoyo que me brindó para poder cumplir con este sueño.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo todos los días de mi vida, por haber sido mi guía en cada paso dado durante mi carrera.

A mi asesora de tesis la Dra. Juana del Valle por todo su apoyo durante la ejecución del trabajo de tesis.

Al Ingeniero Miguel Elguera por brindarme su apoyo durante estos años de estudio.

A mis docentes, amigos y familiares por alentarme a seguir adelante con esta investigación.

Índice de contenidos

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS	8
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Diseño del estudio	9
Grupos de estudio.....	9
Criterios de Selección.....	10
Material vegetal y extractos	10
Cepa micótica y bacteriana.....	10
Determinación de la actividad antimicrobiana	11
Ensayo de Citotoxicidad de D. lorentense.....	12
Plan de análisis estadístico	13
Consideraciones éticas	13
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	14
TABLA N° 1	16
TABLA N° 2	17
FIGURA N° 1.....	18
FIGURA N° 2.....	19
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	20
CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN	23
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS.....	28
Anexo 1: Grupos de estudio	28
Anexo 2: Aprobación de Comité de Ética.....	29

Índice de tablas

TABLA N° 1: Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano y antimicótico del extracto metanólico de hoja de <i>Dracontium loretense</i> sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC®25175™), <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC®10556™) y <i>Candida albicans</i> (ATCC®10231™).....	16
TABLA N° 2: Evaluación de la concentración mínima inhibitoria según el efecto antibacteriano y antimicótico del extracto metanólico de hoja de <i>Dracontium loretense</i> sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC®25175™), <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC®10556™) y <i>Candida albicans</i> (ATCC®10231™).....	17

Índice de figuras

FIGURA N° 1: Evaluación de la concentración mínima inhibitoria según el efecto antibacteriano y antimicótico del extracto metanólico de hoja de <i>Dracontium loretense</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> (ATCC®10231™), <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC®25175™), <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC®10556™).....	18
FIGURA N° 2: Evaluación de la Viabilidad celular de <i>Dracontium loretense</i> sobre la línea celular MDCK.....	19

RESUMEN

Objetivo: Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana y citotóxica del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC® 10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®25175).

Materiales y Métodos: Se preparó el extracto metanólico de *Dracontium lorentense* a diferentes concentraciones. Se evaluó la actividad antimicrobiana de *Dracontium lorentense* sobre cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* mediante el método difusión en agar. La citotoxicidad del extracto (CC₅₀) se determinó haciendo uso de la línea celular MDCK.

Resultados: El extracto metanólico de *Dracontium lorentense* tuvo efecto inhibitor sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* con halos de inhibición de $14.10 \pm 0.65\text{mm}$ y $15.58 \pm 0.43\text{mm}$, respectivamente. Sin embargo, no se observó efecto inhibitor sobre *Candida albicans*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* fue de $500\mu\text{g/ml}$. Mientras que la CMI sobre *Streptococcus sanguinis* fue de $62.5\mu\text{g/ml}$. La citotoxicidad de este extracto sobre la línea celular MDCK se evaluó en un rango de 0 a $900\mu\text{g/ml}$, mostrando que no es citotóxico en altas concentraciones.

Conclusiones: Se observó que *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) presentó efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Sin embargo, no presentó efecto antimicótico sobre cepas de *Candida albicans*. El extracto de esta planta no es citotóxico aún en altas concentraciones

Palabras Claves: Extractos vegetales, *Candida albicans*, Citotoxicidad, *Dracontium lorentense*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*.

ABSTRACT

Objective: The aim to this study was to evaluate the antimicrobial and cytotoxic effect of the methanol extract of *Dracontium lorentense* (Jergon Sacha) against *Candida albicans* (ATCC®10231), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC®25175).

Materials and Methods: The methanolic extract of *Dracontium lorentense* was prepared at different concentrations. The antimicrobial activity of *Dracontium lorentense* was evaluated on strains of *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* by the agar diffusion method. The cytotoxicity of the extract (CC50) was determined using the MDCK cell line.

Results: The results showed that the methanolic extract of *Dracontium lorentense* had inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* with inhibition halos of $14.10 \pm 0.65\text{mm}$ and $15.58 \pm 0.43\text{mm}$, respectively. However, no inhibitory effect was observed on *Candida albicans*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the methanolic extract of *Dracontium lorentense* on strains of *Streptococcus mutans* was 500 $\mu\text{g/ml}$. While the MIC on *Streptococcus sanguinis* was 62.5 $\mu\text{g / ml}$. The cytotoxicity of the methanolic extract of *Dracontium lorentense* on the MDCK cell line was evaluated in a range of 0 to 900 $\mu\text{g / ml}$, showing that it is not cytotoxic in high concentrations.

Conclusion: The experimental findings showed that *Dracontium loretense* (Jergon Sacha) presented an antibacterial effect on the strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. However, it did not present an antifungal effect on strains of *Candida albicans*. The extract of this plant is not cytotoxic even in high concentrations.

Keywords: Plant extracts, *Candida albicans*, Cytotoxicity, *Dracontium loretense*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral presenta diferentes microorganismos que al encontrarse en equilibrio no afectan a las personas.⁽¹⁾ No obstante, ante una alteración en el organismo de los seres humanos, esta microbiota oral puede convertirse en patógena produciendo diversas enfermedades.⁽²⁾ Las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y el hongo oportunista *Candida albicans* son los microorganismos más prevalentes en la flora bucal, quienes ante un desequilibrio inmunológico del huésped se incrementan y producen patologías, tales como Caries dental, Endocarditis bacteriana y Candidiasis oral, respectivamente.⁽³⁻⁵⁾

Con la finalidad de contrarrestar estas enfermedades se tienen a disposición diferentes insumos químicos y naturales de los cuales es necesario evaluar su efecto antimicrobiano. Éstos, tienen como función alterar la morfología de un microorganismo como bacterias y hongos, con el propósito de inhibir su desarrollo para que el sistema inmune del huésped funcione con normalidad.⁽⁶⁾ Además, estos insumos deben presentar una baja citotoxicidad, la cual se evalúa a través de la viabilidad celular y permite detectar el daño que el fármaco produce en la célula, con el objetivo de evitar consecuencias negativas en el organismo.⁽⁷⁾

Ante estas patologías, las industrias farmacéuticas han desarrollado diferentes medicamentos, los cuales pueden generar efectos secundarios en el organismo.⁽⁸⁾ Actualmente, los productos naturales son una alternativa a la medicina convencional, ya que diferentes investigaciones han demostrado que ciertas especies de plantas poseen distintas propiedades curativas, tales como antibacterianas, antimicóticas, antiinflamatorias y antioxidantes, frente a una variedad de patógenos.^(9,10)

El 82% de la población mundial, a través de la fitoterapia, utiliza la medicina alternativa para tratar distintas patologías.⁽¹¹⁾ En el Perú, existen aproximadamente 80 000 especies que pueden ser utilizadas para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Sin embargo, se sabe que sólo el 2% de la flora peruana ha sido objeto de estudio para ser utilizada en la fitoterapia.⁽¹²⁾

Dracontium lorentense, también conocida como Jergón Sacha, es una planta perteneciente a la familia Araceae, utilizada ampliamente en la Amazonía, ya que presenta distintas propiedades curativas como inmunoestimulador y antiinflamatorio.^(13,14) Sin embargo, sus aplicaciones y su impacto clínico en el campo odontológico no han sido estudiados.

Por lo tanto, el estudio de *Dracontium lorentense* sobre los microorganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Candida albicans* es de gran importancia, ya que aporta al campo odontológico nueva información acerca del control antimicrobiano de la cavidad oral a través del uso de la fitoterapia. Esta investigación será la base para que futuros estudios permitan identificar el principio activo de *Dracontium lorentense* con propiedades antimicrobianas.

Por lo antes mencionado, el propósito del presente estudio es evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC®10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™).

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana y citotóxica del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC ® 10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®25175).

Objetivos específicos

1. Determinar *in vitro* la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®25175).
2. Determinar *in vitro* la actividad antimicótica del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC ® 10231™).
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC ® 10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®25175).
4. Evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre la línea celular MDCK.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *Dracontium loretense* (Jergón Sacha) presenta efecto antimicrobiano sobre cepas de *Candida albicans* ATCC[®] 10231[™], *Streptococcus mutans* (ATCC[®] 25175[™]) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC[®] 10556[™]).

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El diseño de este estudio fue de tipo experimental *in vitro*.

Grupos de estudio

La unidad de análisis estuvo conformada por pocillos a los cuales se les agregó extracto metanólico de *Dracontium lorentense* sobre las cepas de *Candida albicans* (ATCC® 10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®25175) y la línea celular MDCK. Se utilizaron 45 muestras para cada patógeno estudiado.

Se incluyeron 7 grupos, el primer grupo estuvo conformado por pocillos con línea celular MDCK (epitelio de riñón canino *Madin-Darby*) cultivados en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), los cuales fueron incubados con el extracto de *Dracotium lorentense* a diferentes concentraciones (rango de 0 a los 900 µg/ml). El segundo grupo, pocillos con línea celular MDCK, cultivados en medio DMEM a las cuales se le adicionó solución salina (control negativo). El tercer y cuarto grupo estuvieron conformados por pocillos con línea celular MDCK, cultivados en medio DMEM a las cuales se le adicionó Clotrimazol al 1% y al otro Clorhexidina al 0.12% como controles positivos. El quinto, sexto y séptimo grupo presentó pocillos con extracto metanólico de *Dracotium lorentense* sobre cultivos de *Candida albicans* (medio de cultivo agar Sabouraud), *Streptococcus mutans* (medio de cultivo agar BHI) y *Streptococcus sanguinis* (medio de cultivo agar BHI), respectivamente, durante 48 horas. (Anexo 1)

Criterios de Selección

Los criterios de selección para este estudio fueron: hojas de la planta *Dracontium lorentense*; pocillos embebidos con extracto metanólico de las hojas de *Dracontium lorentense* a diferentes concentraciones sobre cepas de cultivo de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*; condiciones controladas de la línea celular MDCK, las cuales fueron cultivadas en medio Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de Clotrimazol y 0.12% de Clorhexidina, en condiciones de aerobiosis a 37°C.

Material vegetal y extractos

El *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) fue adquirido del Vivero Forestal de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, del cual se lavaron las hojas con agua destilada estéril minuciosamente y se dejó secar lo recolectado por 3 días a temperatura ambiente. Posterior a ello, se sumergió 100 gr de *Dracontium lorentense* en 200 ml de metanol puro y se colocó en frascos que fueron cubiertos con papel platino, dejándolos reposar por 7 días a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se filtraron en papel filtro Whatman # 41 y las muestras colectadas se evaporaron mediante la técnica de calentamiento indirecto a 55°C hasta la evaporación del metanol y se resuspendió en solución buffer fosfato 1X estéril.

Cepa micótica y bacteriana

Candida albicans (ATCC®10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™) fueron adquiridos del laboratorio GenLab del Perú, representante del laboratorio MicroBiologics (USA).

La muestra de *Candida albicans* fue cultivada en placas de agar Sabouraud estéril siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que las muestras bacterianas fueron cultivadas en placas de *Brain Heart agar* (*S. mutans*) y agar Sangre (*S. sanguinis*). Se realizó este procedimiento presionando la parte superior de la ampolla del tubo que contiene el microorganismo hasta la liberación del líquido que hidrató a las cepas liofilizadas. Luego, se presionó la parte inferior de la unidad y se trituró el sedimento con el líquido hasta que la suspensión del sedimento se volvió homogénea. Posteriormente, el hisopo fue saturado hasta estar hidratado, independientemente, con cada una de las muestras bacterianas y el hongo, fueron transferidos a una placa de agar Sabouraud o de BHI según sea el caso. En cada placa Petri que contenía el material biológico se realizó vetas con un asa de siembra estéril. Las placas fueron incubadas en a 37°C durante 48 horas.

Determinación de la actividad antimicrobiana

El efecto antimicrobiano fue realizado a través del método de difusión en agar.⁽¹⁵⁾ Se utilizó placas de agar con medio Sabouraud para el hongo utilizado y placas de agar BHI para las bacterias del estudio, inoculadas con 0.5 ml de cada una de las 2 cepas (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* se inocularon en una suspensión de 0.5 ml de la escala de McFarland). Se incubaron las placas hasta que el agar se solidificó (3 horas aproximadamente). Posteriormente, con ayuda de un sacabocado estéril se realizó perforaciones en cada una de las placas, cada pocillo tenía 9mm de diámetro y estos fueron sellados con 0.1ml del mismo agar.

A cada pocillo se le adicionó 0,2 ml de cada uno de los extractos evaluados, como control positivo se utilizó 0,2 ml de Clotrimazol al 1% y 0.2 ml de Clorhexidina al 0.12%; como

control negativo 0.2 ml de solución salina 1X estéril. El experimento se realizó siguiendo condiciones de bioseguridad tipo II. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 48 horas, en condiciones controladas de aerobiosis para *Candida albicans* y anaerobiosis para *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Posteriormente, se midió los halos de inhibición con ayuda de una regla milimetrada, la medida de los halos se reportaron en milímetros (mm).

Ensayo de Citotoxicidad de *D. lorentense*

La citotoxicidad del extracto metanólico del *Dracontium lorentense* fue evaluado utilizando la prueba colorimétrica que se basa en la reducción de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) por las enzimas mitocondriales (1, 2, 3). El experimento fue realizado en una microplaca de 96 pocillos estéril (8 mm de diámetro). Se evaluó la citotoxicidad utilizando la línea celular MDCK, la cual fue cultivada en medio Dulbecco suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de Clotrimazol y 0.12% de Clorhexidina, en condiciones de aerobiosis a 37°C.

Se cultivó 1×10^4 células/pocillo en 200 μ L de medio. Se incubó las muestras a temperatura ambiente en un medio húmedo al 5% de CO₂ por un periodo de tiempo de 24 horas. Seguidamente se adicionó a la monocapa celular, el extracto metanólico de *Dracontium lorentense* en sus distintas concentraciones, desde 0 a los 900 μ g/ml. En cada ensayo se colocó un control negativo de viabilidad celular, el cual fue suero de bovino. ⁽¹⁶⁾

Se incubó la siembra a temperatura ambiente por un periodo de tiempo de 6 días. Todos los días se observó la morfología de las células a través de un microscopio. Después, se añadió

20 μ L de solución de MTT a los pocillos. Se incubaron las muestras por un periodo de tiempo de 3 horas a temperatura ambiente. El medio fue removido para conseguir cristales de formazán, y luego se diluyeron con 200 μ l de Dimetil Sulfóxido.

Se calculó la viabilidad de las células a través del porcentaje de la absorbancia de los pocillos con tratamientos versus el control negativo. La absorbancia fue cuantificada a una longitud de onda de 530 nm con ayuda de un lector de ELISA (Biorad).⁽¹⁷⁾

Plan de análisis estadístico

El análisis univariado se obtuvo mediante la estadística descriptiva, la cual brindó las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (valor mínimo, valor máximo y desviación estándar) de las variables estudiadas.

El programa Microsoft Excel se utilizó para la recolección de datos y los resultados fueron analizados a través del programa estadísticos Stata[®] versión 12.0.

Consideraciones éticas

El presente trabajo de investigación fue exonerado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

El presente estudio, experimental *in vitro*, se basó en la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™), *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™) y *Candida albicans* (ATCC®10231™); así como, la determinación *in vitro* de la citotoxicidad de dicho extracto. Nuestros resultados muestran que el extracto metanólico de *Dracontium lorentense* presentó efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™); sin embargo, no presentó efecto antimicótico sobre las cepas de *Candida albicans* (ATCC®10231™). Además, el extracto metanólico de *Dracontium lorentense* no presentó citotoxicidad sobre las cepas de la línea celular MDCK.

En la tabla 1 se muestra que al aplicar el extracto metanólico *Dracontium lorentense* sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATC®25175™), el resultado de halo de inhibición es de 14.10 ± 0.65 mm. Mientras que, para *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™) se observó halos de inhibición fue de 15.58 ± 0.43 mm. En el caso de *Candida albicans* (ATCC®10231™) no se encontró formación de halos de inhibición en ninguna de sus diferentes concentraciones en las que se trabajó. (**Tabla N° 1**)

En la tabla 2 se observa que la dilución de 500 µg/ml es la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de esta planta sobre las cepas de *Streptococcus mutans*. Con respecto a la CMI del extracto metanólico de las hojas sobre *Streptococcus sanguinis*, se obtuvo en la

concentración de 62.5µg/ml. Al evaluar este extracto sobre *Candida albicans* no se encontró CMI, ya que no hubo formación de halos de inhibición. **(Tabla N° 2 y Figura N° 1)**

En la Figura 2, se observa los resultados de citotoxicidad del extracto metanólico de las hojas de *Dracontium loretense* sobre la línea celular MDCK, utilizando concentraciones de 0 a 900µg/ml, mostrando que no es citotóxico en altas concentraciones. Los valores encontrados fueron corroborados a través de la observación en el microscopio, en el cual no se visualizó disminución del número de células ni del efecto citopático. Es decir, el extracto metanólico de *Dracontium loretense* no contiene compuestos activos que producen cambios en la morfología de las células. **(Figura N° 2)**

TABLA N° 1

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano y antimicótico del extracto metanólico de hoja de *Dracontium lorentense* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™), *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™) y *Candida albicans* (ATCC®10231™)

Microorganismo	Grupo	Media	Mediana	D.E	Mínimo	Máximo
<i>Streptococcus mutans</i>	Hoja*	14.10	14.00	0.65	13.50	15.00
	CHX 0.12%*	26.40	26.00	1.14	25.00	28.00
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Hoja*	15.58	15.50	0.43	15.00	16.00
	CHX 0.12%*	27.12	27.80	1.12	25.80	28.00
<i>Candida albicans</i>	Hoja*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	CHX 0.12%*	24.60	24.00	0.89	24.00	26.00
	CTZ 1%	30.00	30.00	4.85	23.00	35.00

* Mediciones en mm

CHX: Clorhexidina

CTZ: Clotrimazol

TABLA N° 2

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria según el efecto antibacteriano y antimicótico del extracto metanólico de hoja de *Dracontium loretense* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™), *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™) y *Candida albicans* (ATCC®10231™)

Microorganismos	Concentración (µg/ml)								
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
<i>Streptococcus mutans</i>	14.10	12.90	12.40	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus sanguinis</i>	15.58	14.16	14.20	13.00	12.88	12.24	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mediciones en mm

FIGURA N° 1

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria según el efecto antibacteriano y antimicótico del extracto metanólico de hoja de *Dracontium lorentense* sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC®10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC®25175™), *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556™)

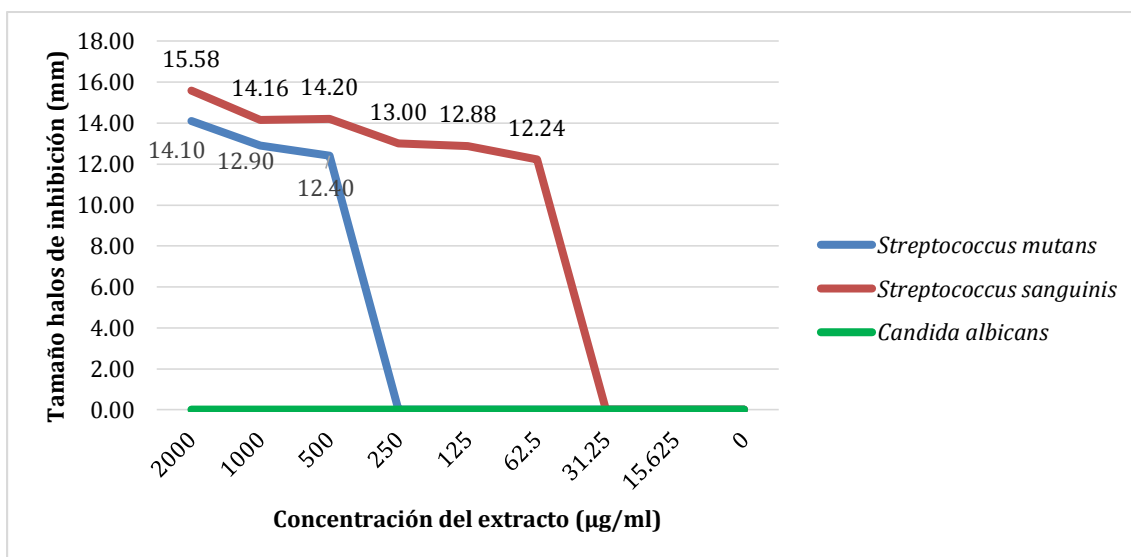
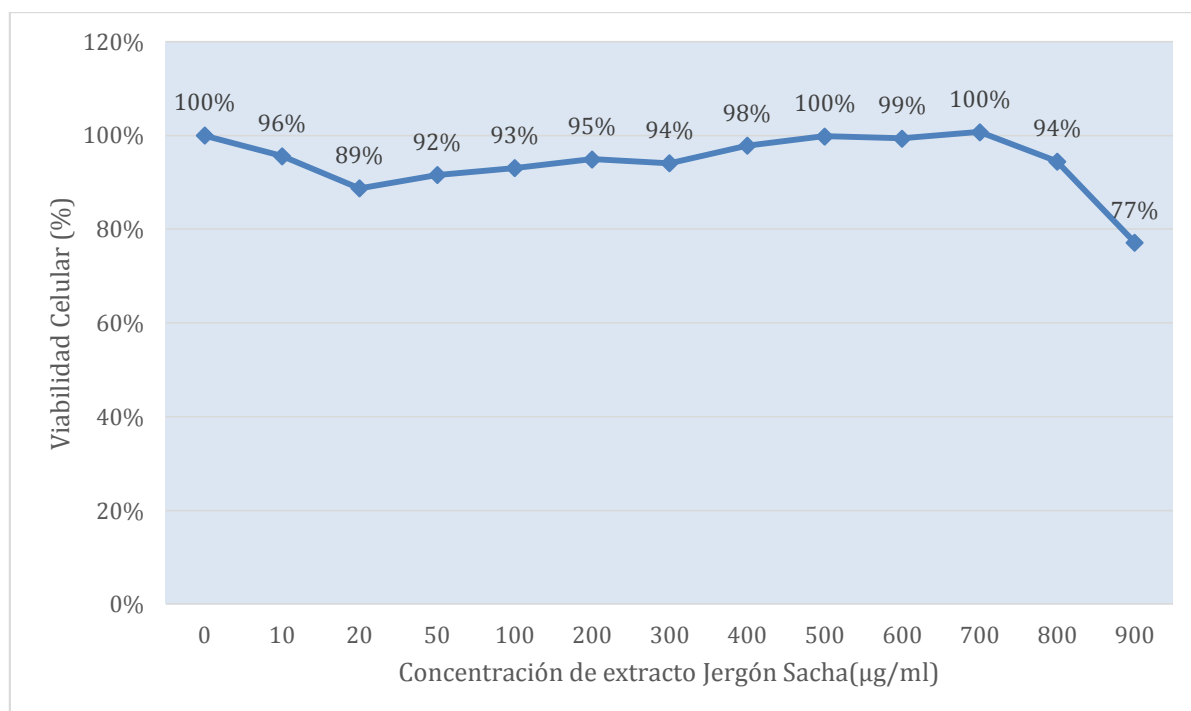


FIGURA N° 2

Evaluación de la Viabilidad celular de *Dracontium loretense* sobre la línea celular MDCK

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

El efecto antimicrobiano ha sido evaluado en diversos estudios utilizando las plantas medicinales, con la finalidad de ser empleadas como medicina alternativa para tratar distintas patologías, ya que presentan una baja toxicidad para el organismo. Por tal motivo, el presente estudio tiene como propósito evaluar el efecto antimicrobiano y citotóxico del extracto metanólico de las hojas de *Dracontium loretense* (Jergón Sacha) sobre las cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Candida albicans*. Esta investigación fue realizada mediante el método de difusión en agar.⁽¹⁵⁾

A *Dracontium loretense* se le atribuyen distintas propiedades curativas tales como antitumoral, antifídico, estimulante del sistema inmune⁽¹⁸⁾, y es muy utilizado por los pobladores peruanos; sin embargo; anteriormente, no se han realizado investigaciones previas de Jergón Sacha sobre patógenos de la microbiota oral.⁽¹³⁾ En el presente estudio se encontró que el extracto metanólico de esta planta tuvo efecto antimicrobiano sobre las cepas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*; sin embargo, no tuvo efecto sobre *Candida albicans*. Además, se observó que presenta baja citotoxicidad.

Según un estudio realizado por Lock y col., *Dracontium loretense* contiene Cerebrosidas, Ceramidas y, principalmente, cuatro tipos de Oxilipinas, las cuales son las encargadas de su actividad inmunomoduladora.⁽¹⁴⁾ Según la literatura, las Oxilipinas son un tipo de ácido graso que le permiten el desarrollo a la planta; así como, ejercer una respuesta de defensa frente a un proceso infeccioso ocasionado por algún patógeno.⁽¹⁹⁾ Sin embargo, no se han realizado estudios de la acción antibacteriana de las Oxilipinas extraídas de *Dracontium loretense*.

Las bacterias como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*, poseen una estructura celular más sencilla que los hongos, permitiendo que los antibióticos actúen de manera efectiva sobre estas bacterias. ⁽²⁰⁾ Los antibióticos de uso comercial ejercen su acción al inhibir la síntesis de proteínas o bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos. Sin embargo, en el caso de Jergón Sacha no se conoce el principio activo ni mecanismo de acción frente a las bacterias. ⁽²¹⁻²²⁾ Por otro lado, Medina y col, también, encontraron efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Bixa orellana* sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*; al igual que López y col., quienes hallaron actividad antibacteriana del extracto metanólico de Té verde sobre estos patógenos. No obstante, cabe resaltar, que la media de los halos de inhibición encontrados en sus estudios fue mayor al presentado por el extracto de Jergón Sacha. ⁽²³⁻²⁴⁾

Los hongos, como *Candida albicans*, son más resistentes que las bacterias debido a la naturaleza de su membrana; su pared celular es multilaminada y está recubierta por quitina. ⁽²⁵⁾ Estas características podrían ser algunas de las razones por las que Jergón Sacha no tuvo efecto sobre este hongo. Los antifúngicos de uso comercial actúan sobre el Ergosterol, el cual es un lípido muy importante para las actividades de este hongo, y se encuentra en su pared celular. ⁽²⁶⁾ Estos resultados se diferencian de los obtenidos por Okechukwu y col., quienes encontraron efecto antimicótico sobre *Candida albicans* a través del uso del extracto metanólico de las hojas de *Cleistopholis patens*. La actividad antimicótica de la planta se asoció a la presencia de cantidades elevadas de alcaloides, terpenoides, saponinas, glucósidos y esteroides; compuestos que no están presentes en *Dracontium lorentense*, lo que podría haber impedido la inhibición del crecimiento de este hongo. ⁽²⁷⁾

A pesar, de encontrarse efecto antibacteriano en nuestro extracto sobre las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*, se debe resaltar que el grupo control positivo, Clorhexidina al 0.12% generó una media mayor en la formación de los halos de inhibición al mostrado por Jergón Sacha. Así también, Clotrimazol al 1% sobre las cepas de *Candida albicans*. Por tal motivo, se necesita realizar mayores estudios de esta planta, ya que se está encontrando efecto antibacteriano sobre los patógenos estudiados; sin embargo, a diferencia de otras investigaciones, el tamaño de halos de inhibición producidos por el extracto de la planta es menor. Además, se demostró que el extracto metanólico de Jergón Sacha no fue citotóxico; a diferencia de Clotrimazol y Clorhexidina que presentaron menor viabilidad celular frente a las células MDCK en altas concentraciones, por lo que Jergón Sacha podría ser seguro para las personas que lo ingieren.

Esta investigación debe tomarse con cautela, ya que al ser realizada *in vitro* no se puede afirmar que se obtengan los mismos resultados al ser ejecutados clínicamente. Por ello, a merita realizarse mayores estudios que complementen la información brindada. Se recomienda que en investigaciones futuras se compare el efecto antimicrobiano de las diferentes estructuras de *Dracontium loretense* para dar a conocer si presentan diferencias en el tamaño de la formación de los halos de inhibición; así como, realizar estudios farmacológicos de esta planta para conocer cuál es su mecanismo de acción y el principio activo que permite que tenga efecto antibacteriano sobre los microorganismos evaluados, con la finalidad de desarrollar nuevos medicamentos a base de esta planta.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN

Los hallazgos experimentales demostraron que *Dracontium loretense* (Jergón Sacha) presentó efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Sin embargo, no presentó efecto antimicótico sobre cepas de *Candida albicans*. El extracto de esta planta no es citotóxico aún en altas concentraciones.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cruz S, Díaz P, Arias D, Mazón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Rev Cubana Estomatol.* 2017; 54(1): 84-99.
2. Serrano H, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev. CES Odont.* 2015; 28(2):1-5.
3. Kashem S, Igyártó B, Gerami M, Kumamoto Y, Mohammed J, Jarret E, et al. *Candida albicans Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation.* *Immunity.* 2015; 42(2): 210-3.
4. Marlise K, Geelsu H 2 Santos P, Campanella O, Hyun K. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5(10): 1-8.
5. Mounika S, Jagannathan N. Association of Streptococcus Mutants and Streptococcus Sanguis in Act of Dental Caries. *J Pharm Sci & Res.* 2015; 7(9):764-66.
6. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica.* 6ta ed. España: Elsevier. 2009; p. 701-791.
7. Akter R, Uddin S, Grice, I, Tiralongo E. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *J Nat Med.* 2014; 2(1):246-68.
8. Herrera S, García L, Martínez D, Rojas O, Baltazar R. Efectos adversos de los antibióticos sobre la mitocondria y su asociación con variantes genéticas del ADN mitocondrial en población mexicana. *Rev Mex Cienc Farm.* 2015; 46 (4): 15-24.

9. Ruiz M, Pardo M. Conocimiento y uso de plantas medicinales en estudiantes universitarios. *Revista de Fitoterapia*. 2015; 15(1): 53-67.
10. Bendezú G, Torres C, Aceveo T, Alarco J, Arroyo H. Investigación sobre plantas medicinales realizada por estudiantes de medicina en Perú. *Revista de Fitoterapia*. 2015; 15(2): 165-171.
11. OMS. Manual de Fitoterapia. [Internet]. EsSalud. 2001. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>
12. Pamo OG. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2009; 26(3):314-23.
13. Lovera A, Bonilla C, Hidalgo J. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *Dracontium lorentense* (JERGÓN SACHA) sobre la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2006; 23(3):1-5.
14. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *NPC*. 2016; 11(3): 315-337
15. Alvarez M, Izasa M, Echeverry H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austrocupatorium inulaefolium* HBK (salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* HBK (clavo de laguana). *Biosalud*. 2005; 14:46-55.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Document M07-A8. Eighth edition, Wayne, PA: CLSI; 2009.
17. Tallarida R, Murray R. Manual of pharmacologic calculation with computer programs. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 1987.

18. Quattrocchi U. CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. 5th.ed. San José: CRC Press; 2016.
19. Vellosillo T, Martínez M, López M, Vicente J, Castresana C, Dolan L, y col. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plan cell*. 2007; 19: 831-848.
20. Ojeda J, Oviedo G, Salas L. Streptococcus mutans y caries dental. *CES odontol*. 2013; 26(1): 44-5.
21. Calvo J, Martínez L. Antimicrobial mechanisms of action. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27:44-52.
22. Benavides A, Napolitano A, Cassarello C, Carbone V, Gazzero P, Malfitano AM, y col. Oxylipins from Dracontium lorentense. *Journal of Natural Products*. 2009; 72(1):813-817.
23. Medina D, Ulloa G, Camere R, Caballero S, García F, Del Valle J. Antibacterial activity of Bixa orellana L. (achiote) against Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016; 6(5): 400–403.
24. López G. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de la Camellia sinensis (té verde) frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175) y al Streptococcus sanguinis (ATCC 10556). [Tesis para optar grado de Cirujano Dentista] Lima Perú: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2014.
25. Vishnu A, Priyanka L, Vikas P. Effect of Plant Oils on Candida albicans. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010; 43(5):447–451.

26. Ávila K, Caballero C, Arias J, Zavala, Dzul R. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. *Rev Biomed*. 2016; 27(1):127-136.
27. Okechukwu D, Momoh M, Esimone C. Evaluation of the anti-candidal activity of methanolic leaf extract of *Cleistanthus patens* (fam. Annonaceae) on candida species isolated from stage II HIV patients. *Afr Health Sci*. 2015; 15(3): 789–796.

ANEXOS



Anexo 1: Grupos de estudio

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
Pocillos con línea celular MDCK en medio DMEM	Pocillos con línea celular MDCK en medio DMEM	Pocillos con línea celular MDCK en medio DMEM	Pocillos con línea celular MDCK en medio DMEM	Pocillos con extracto metanólico de <i>Dracontium loretense</i>	Pocillos con extracto metanólico de <i>Dracontium loretense</i>	Pocillos con extracto metanólico de <i>Dracontium loretense</i>
+	+	+	+	+	+	+
Extracto metanólico de <i>Dracontium loretense</i>	Solución salina	Clotrimazol al 1%	Clorhexidina al 0.12%	<i>Cándida albicans</i> (Medio de cultivo Agar Sabouraud)	<i>Streptococcus mutans</i> (Medio de cultivo BHI)	<i>Streptococcus sanguinis</i> (Medio de cultivo BHI)



Anexo 2: Aprobación de Comité de Ética



CEI/EX1-12-16

Chorrillos, 28 de diciembre del 2016

Alumna
Paola Manrique H.
 Alumna de la Carrera de Odontología
 Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas
Presente.-

UPC

Universidad Peruana de
 Ciencias Aplicadas

Avenida Alameda
 San Marcos cuadra 2
 Chorrillos
 Lima 9-Perú
 T 511 313 3333
 www.upc.edu.pe

PI-EX 1 Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano y citotóxico del extracto metanólico exigote: innova
Dracontium lorentense (JERGÓN SACHA) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC[®] 10231™), *Streptococcus mutans* (ATCC[®] 25175™) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC[®] 10556™)

Estimada investigadora:

Hemos recibido el protocolo de investigación, y los documentos de soporte, los cuales han sido revisados en detalle. Luego de esta revisión, se concluye que esta investigación queda **EXONERADA DE REVISIÓN (EXENTO)** adicional por parte del Comité de Ética e Investigación (CEI) de la Facultad de Ciencias de la Salud. La determinación de esta categorización se basa en lo establecido en el reglamento del Comité.

De acuerdo a lo declarado en el protocolo en mención, el CEI da por sentado que el estudio no implica:

- Recolección de datos a partir de seres humanos, animales ni especies de flora silvestre en situación de amenaza
- Evaluación de especímenes biológicos procedentes de seres humanos y animales (suero, orina, heces, cabello, placenta, piezas dentales o cualquier tipo de tejido/órgano), así hayan sido recogidos previamente y se encuentren en preservación.

Los investigadores deben de informar al Comité sobre cualquier cambio en el protocolo posterior a este dictamen. Del mismo modo, de forma anual y desde esta fecha, los investigadores deben enviar un breve informe de avances al Comité y un breve informe final al momento del cierre definitivo del estudio. El comité se reserva el derecho de supervisar de manera inopinada la progresión de la investigación en cualquier momento y bajo cualquier modalidad.

Sin otro particular, quedo de ustedes.

Eddy Roberto Segura Paucar, MD, MPH
 Presidente del Comité de Ética
 Facultad de Ciencias de la Salud