

Universidad del Bío-Bío
Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias Básicas



Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Eucalyptus globulus* sobre la formación de biopelícula de *Streptococcus mutans*; potencial acción preventiva del desarrollo de placa bacteriana

María del Pilar Acosta Zambrano

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias biológicas

Profesora Guía Dr. Andrés Rodríguez Morales

CHILLAN, 2020

DEDICATORIA

**A mis dos hijos Sofia y Miguel Ángel que sueñan
con ser investigadores cuando crezcan,
porque, con ellos he aprendido
el valor de alcanzar las metas,
hacer realidad lo que te propones, pero, sobre todo
amor y dedicación.**

ÍNDICE

Agradecimientos	6
Resumen	6
1. Introducción	8
1.1 Formación de Biopelícula	9
1.2 Cuorum sensing: un mecanismo para formación de biopelículas	10
1.3 Biopelícula microbiana oral	12
1.4 <i>Streptococcus mutans</i> y su importancia en la placa dental	15
1.5 Glucosiltransferasas	16
1.6 Fitoterapia una nueva alternativa de tratamiento medicinal:	19
1.7 <i>Eucalyptus globolus</i> Labell	20
1.8 Productos naturales	20
1.8.1 Alcaloides	21
1.8.2 Fenoles	21
1.8.3 Saponinas	22
1.8.4 Cumarinas	22
1.9 Hipótesis	23
1.10 Objetivos	23
1.10.1 General	23
1.10.2 Específicos	23
2. Materiales y Métodos	24
2.1 Preparación del extracto vegetal	24
2.2 Fraccionamiento del extracto vegetal	24
2.3 Pruebas fitoquímicas	25

2.3.1	Alcaloides	24
2.3.2	Fenoles	25
2.3.3	Flavonoides	25
2.3.4	Saponinas	25
2.3.5	Cumarinas	26
2.4	Cultivo de cepa Bacteriana <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35668	26
2.5	2.5 Determinación de concentración mínima inhibitoria	25
2.6	Ensayo de formación de Biopelícula en placas de polietileno	26
2.7	Actividad Enzimática	27
2.8	Análisis estadístico	28
3.	Resultados	29
3.1	Identificación cualitativa de productos naturales	29
3.2	3.2 Inhibición del crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> por las diferentes fracciones del extracto	30
3.3	Inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> por el extracto hidroalcohóli respecto al tiempo	31
3.4	Inhibición en la formación de Biopelícula <i>Streptococcus mutans</i>	32
3.5	Evaluación de la producción de Glucano por <i>Streptococcus mutans</i> presencia de diferentes concentraciones del Extracto hidroalcohólico de <i>Eucalypto globolus</i>	33
4.	Discusión	35
5.	Referencias bibliográficas	40
6.	Anexos	48

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitir cumplir este sueño dándome sabiduría y guiándome a diario, permitiéndome finalizar otra etapa de la vida. A mis hijos Sofia y Miguel ángel por su amor y comprensión. A mis amados padres, Jacinto Acosta y Lily Zambrano por forjar en mi la perseverancia y el esfuerzo y la constancia para obtener este triunfo.

A Pedro Andrés, quien me enseñó amar y disfrutar cada día de nuestras vidas y me apoyo en esas noches largas de estudio.

A profesor Alejandro Marchant por su ejemplo y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A el doctor Enrique Werner ayuda en la elaboración de esta investigación.

Y por último agradecer enormemente al profesor Andrés Rodríguez por su dedicación y tiempo en la corrección y colaboración en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Biopelícula, es el conjunto de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de polisacáridos, permitiendo su adherencia a una superficie inerte o tejido vivo. Un ejemplo de microorganismo patógeno formador de esta estructura es *Streptococcus mutans*, agente etiológico de la caries, acidófila y formadora de glucanos mediante la activación de la enzima glucosiltransferasas, ayudando a formar la biopelícula oral. Esta estructura incrementa cambios en la superficie del diente y colabora en el desarrollo de diferentes patologías orales. Los productos naturales provenientes de plantas son una alternativa eficiente para la prevención y tratamiento de la caries y otras patologías orales. En el presente estudio proponemos que el extracto hidroalcohólico de *Eucalypto globulus* inhibe la actividad glucosiltransferasa y formación de la biopelícula *Streptococcus mutans* ATCC 35668. En este trabajo se investigó la presencia de diferentes productos naturales por reacciones colorimétricas obtenidos por separación con algunos solventes hexano, cloroformo/acetato y agua; Se determinó la concentración mínima inhibitoria de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico (5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL) contra *Streptococcus mutans*, la alteración la formación de la biopelícula y la actividad glucosiltransferas mediante producción de glucano no soluble. El nivel de significancia estadística se estableció en $P < 0,05$. Se pudo determinar la presencia de varios productos naturales (fenoles, flavonoides, taninos, saponinas y cumarinas) que disminuían considerablemente la proliferación celular. La concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Eucalypto globulus* fue 20 µg/mL. Se observó una relación inhibitoria entre la concentración de extracto (40, 80 y 160 µg/mL) y la formación de biopelícula y actividad glucosiltransferasa. En conclusión, los productos naturales presentes en el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* inhiben la acción de glucosiltransferasas y formación de la biopelícula factores cariogénicos de *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Biofilm is a set of microorganisms that grow embedded in a polysaccharide matrix, allowing their adherence to an inert surface or living tissue. An example of a pathogenic microorganism that forms this structure is *Streptococcus mutans*, an etiological agent of caries, acidophilus and glucan-forming agent by activating the enzyme glucosyltransferases, helping to form the oral biofilm. This structure increases changes in the tooth surface and collaborates in different oral pathologies development. Natural products from plants are an efficient alternative for prevention and treatment of cavities and other oral pathologies. In the present study we propose that the hydroalcoholic extract of *Eucalypto globulus* inhibits the glucosyltransferase activity and formation of the biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 35668. In this work the presence of different natural products was investigated by colorimetric reactions obtained by separation with solvents like hexane, chloroform / acetate and water; The minimum inhibitory concentration of different concentrations of the hydroalcoholic extract (5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g} / \text{mL}$) against *Streptococcus mutans*, the alteration of the biofilm formation and the glycosyltransferase activity by production of non-soluble glucan was determined. The level of statistical significance was established at $P < 0.05$. It was possible to determine the presence of several natural products (phenols, flavonoids, tannins, saponins and coumarins) that considerably decreased cell proliferation. The minimum inhibitory concentration of the hydroalcoholic extract of *Eucalypto globulus* was 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$. An inhibitory relationship was observed between extract concentration (40, 80 and 160 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and biofilm formation and glycosyltransferase activity. In conclusion, the natural products present in the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* inhibit the action of glucosyltransferases and the formation of the biofilm cariogenic factors of *Streptococcus mutans*.

1. INTRODUCCION

Una biopelícula microbiana (BM), se define como un conjunto de microorganismos, de distintas especies, que se agrupan en un agregado autoproducido de sustancias poliméricas, formando una comunidad o consorcio microbiano (1). La BM se caracteriza por presentar una alta densidad celular, conformada por una importante cantidad de especies generando en sí mismo un microecosistema bastante heterogéneo (2). Este microecosistema, facilita el intercambio genético y expresión de genes que, en algunos casos, otorga una alta tasa de resistencia a agentes antimicrobianos como es el caso de los antibióticos (3).

Es así como las BM's facilitan la supervivencia microbiana al no solo a través del intercambio genético, sino además por que la BM misma es una estructura que da abrigo a los microorganismos que la constituyen. Una BM puede proteger de cambios extremos en el medio ambiente circundante, como la desecación, fluctuaciones de temperatura y pH, en incluso oscilaciones térmicas (4). De acuerdo a Flemming et al., (2016) este sistema es comparable a un matriz porosa, que puede filtrar moléculas ambientales, posibilitando una selección o discriminación entre componentes valiosos (nutrientes) de otros adversos. Por otro lado, los microorganismos que conforman la BM, pueden liberar enzimas digestivas extracelulares, a través de la matriz, que cumplen la función esencial de degradar e sustancias o eliminar otros microorganismos que no participan en la formación de esta estructura. Algunos ejemplos interesantes, son la proteína Bap de *Staphylococcus aureus*, que ayuda en la adhesión celular y aglutinación bacteriana. Otro caso interesante es la *Pseudomona aeruginosa*, que produce proteasas y elastinasas que aseguran la eliminación de otros microorganismos y maximizar el poder patogénico de la *Pseudomona* (5).

La alta capacidad de protección que genera la BM, se debe a la presencia de una serie de componentes extracelulares distribuidos en este medio acuoso. Estos componentes extracelulares son del tipo exopolisacáridos (EP) (1), que se caracterizan por ser exudados microbianos del tipo polisacárido o proteico, que permiten la cohesión celular a una superficie, otorgando la estructuración de la BM (5).

De acuerdo a lo expresado por Flemming et al (2016), la composición exopolisacárida de la BM, le otorga una serie de propiedades del tipo mecánica, además de determinar gran parte de la actividad fisiológica de los organismos que la constituyen (5). La matriz de la BM permite un medio continuo y dinámico, que puede facilitar la formación de microcolonias y en algunos casos se generan niveles o estadios multisuperficiales (6 y 7). Por otro lado, la fracción proteica de las BM, permite la estabilización en medios acuosos. Un ejemplo en este sentido, es la generación de hidrofobinas en colonias de *Bacillus subtilis*, que permiten una BM hidrófoba, tolerando de manera más efectiva, un ambiente acuoso. (8).

1.1 FORMACIÓN DE LAS BM

La formación de BMs es un proceso complejo, dividido en varias etapas, que comienza con la adhesión bacteriana a una superficie a través de varios recursos celulares como microestructuras (pili, fimbrias) y/o componentes extracelulares EPs (figura1). Después del primer paso los microorganismos comienzan a desarrollar microcolonias, donde se pueden encontrar diversas especies interactuando comunitariamente. Posteriormente, ocurre la etapa de maduración de la BM que se caracteriza por la formación de la matriz que brinda cohesión y una estructura tridimensional. Finalmente, los microorganismos se pueden dispersar y las células recuperar su vida plantónica y así participar en la colonización de otras superficies (9).

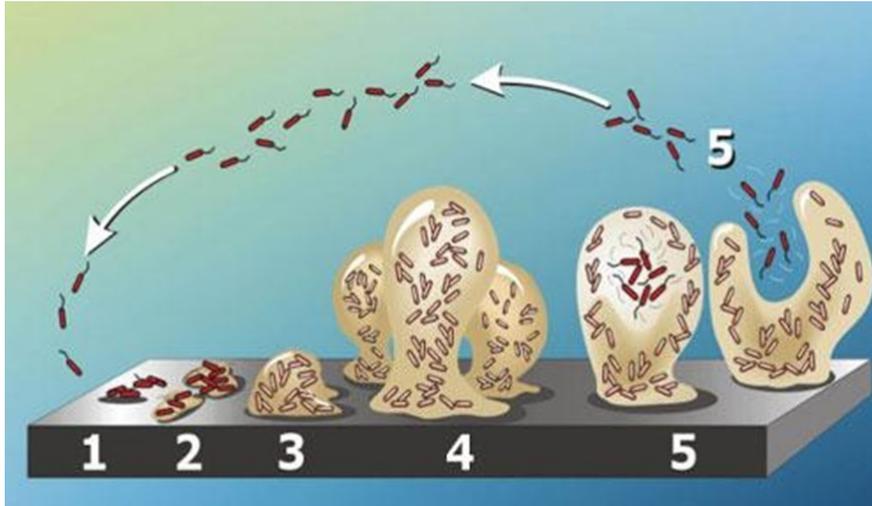


Figura 1: Formación y Maduración de una biopelícula sobre una superficie sólida. 1- Formación, 2- Adhesión en una superficie; 3- Proliferación; 4- Formación de exopolisacaridos; 5- Maduración y 6- Dispersión. Thelwell A. Biofilm Formation. 2017

1.2 Cuorum sensing: un mecanismo para formación de biopelículas:

El cuorum sensing (CS) se define como el umbral microbiano que permite y facilita la expresión e intercambio genético y la respuesta coordinada a cambios en el entorno (10). CS se reconoció en los años 90, mediante el descubrimiento de proteínas que participan en este mecanismo, el cual es crucial para el intercambio de información genética entre células y translocación de genes participantes en factores de defensa o virulencia (11). Es importante señalar que este proceso no es igual en todos los grupos bacterianos, ya que depende del carácter Gram de la bacteria, así como su metabolismo según especie y familia. Las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas poseen un “sistema de detección de CS que les permite comunicarse dentro de su propia especie, vivir en un medio heterogéneo y permitiendo comunicación” (12). Este proceso se caracteriza por la “producción, detección y respuesta a moléculas de señalización extracelulares” denominadas Autoinductores (AI) (13). El sistema CS depende de tres principios básicos: primero, todas las células producen el AI los que son liberados en el medio extracelular. Cuando aumenta la densidad poblacional la producción y concentración de AI es mayor

alcanzando el umbral. Segundo, los AI son detectados por receptores presentes en la membrana celular. En tercero, la detección de AI activa la expresión de genes necesarios para el comportamiento colaborativo bacteriano. (14 y 15)

Un ejemplo es la bacteria *Aliivibrio fischeri* (Gram-negativa) la cual presenta dos proteínas LuxI y Lux R, como se puede observar en la figura 2a, la primera tiene acción autoinductor sintasa formadora de autoinductor acilhomoserina lactona y la segunda de receptor autoinductor que cumple función de activador transcripcional que se une al ADN controlando la expresión génica de Luciferasa (12). Este mecanismo regulado por homólogos LuxI/R identificada en diferentes especies y la acil homoserina lactona (AHL) como molécula inductora, permiten principalmente la comunicación intra especies (13). Por el contrario, las bacterias Gram-positivas presentan un mecanismo de CS diferente (fig 2b), aquí los autoinductores son oligopéptidos modificados que son detectados por receptores de histidina quinasa unidos a componentes de membrana. Un ejemplo de ellos se presenta en algunas especies de *Streptococcus spp* que generan péptidos shp y comS, estos se detectan y generan la fosforilación permitiendo la expresión del factor de transcripción Rgg generando la síntesis de algunos exopolisacaridos (14).

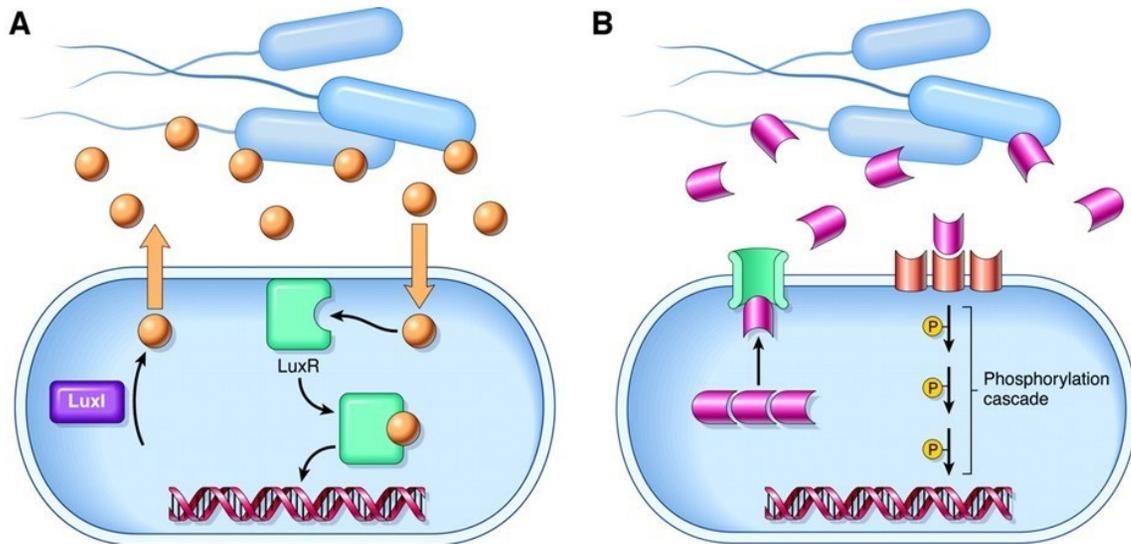


Figura 2: Representación del *Cuorum sensing* en bacterias Gram-negativas (A) y Gram-positivas (B). Extraído de Raffa et al., (2005).

Las investigaciones realizadas para determinar y caracterizar los sistemas de detección CS y la expresión de genes en microorganismo periodontales en general se han limitado a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, varias investigaciones también identificaron genes homólogos luxS en otros patógenos como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Eikenella corrodens* (16 y 17). Los patógenos periodontales presentan la maquinaria para detectar el cuorum mediado por la molécula acil homosrina lactona (AHL), misma molécula encontrada en *Streptococcus* orales y *Aliivibrio fischeri* (15).

1.3 BM oral:

La BM oral es la forma en que las bacterias crecen en la cavidad oral, se dice que esta estructura es la responsable de las caries y de las enfermedades periodontales presentando una gran resistencia a los antimicrobianos (18). Son comunidades bacterianas tridimensionales adheridas una superficie sólida como el esmalte de los dientes, la raíz o

implantes dentales (19) embebidos en una matriz de exopolisacáridos (figura 3). Los estudios de microscopía óptica y electrónica sobre resina y dientes extraídos realizados por Listgarten et al., (1976) permitieron reconocer la naturaleza compleja de esta BM, observaron la formación de microcolonias perpendiculares a la superficie de la corona (20). Según lo documentado por Zijngé et al., (2010) las bacterias cocáceas Gram-Positivas se presentaban en su mayoría entre la estructura, y algunas cadenas aisladas se encontraron después de un día de crecimiento en las otras partes del diente. Después de tres semanas, la BM era predominantemente filamentosa sin dejar ningún signo de bacterias cocáceas. Los filamentos parecían haber colonizado y posteriormente sustituido a la población predominantemente cocácea (21). Se pensaba que estas láminas eran agregados bacterianos con una célula filamentosa central rodeada de cocáceas unidas a ella. Después de dos meses, las características generales de la BM se parecían a las encontradas en el punto de tiempo de tres semanas. Existieron diferencias significativas en el área gingival, donde una capa difusa de espiroquetas cubría la BM. Esta capa difusa contenía agregados bacterianos que se asemejaban a microestructuras filamentosas de distribución radial. En un estudio de salud oral se examinaron los dientes provenientes de pacientes con gingivitis y otras enfermedades periodontales, se observó que la placa era igual a la presentada en los dientes extraídos o resinas de dos meses de antigüedad; las bacterias mayoritarias eran filamentosas con una matriz extracelular bien definida. La capa consistía en espiroquetas y bacterias móviles (flageladas) (21 y 22).

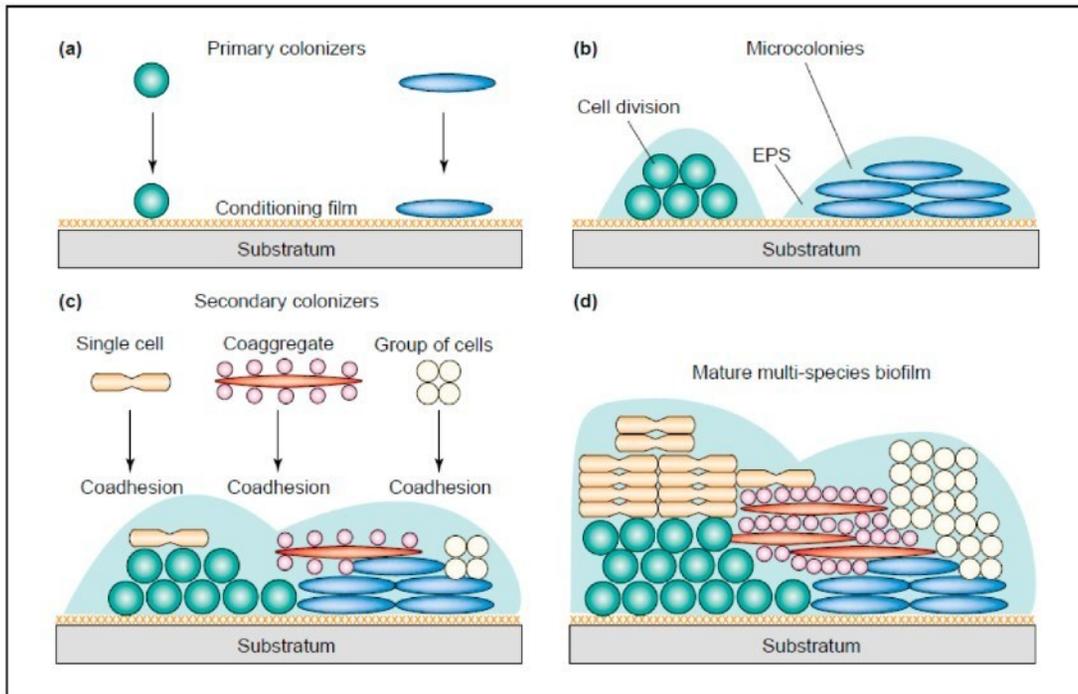


Figura 3: Colonización bacteriana en el esmalte dental. (a) Primeras bacterias colonizadoras. (b) Primeras Colonias. (c) Cohesión de células individuales y coagregados. (d) Formación de la placa oral. Lof, et al.; 2017.

Mediante pruebas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), se demostró *in vivo* que la formación inicial de BM era el resultado de la agregación conjunta y la adhesión entre *Streptococcus spp.* y *Actinomyces spp.* (23). En un estudio posterior con la misma técnica, se demostró *in vivo*, que después de siete días, la proporción de *Streptococcus spp.* disminuía y la proporción de *Fusobacterium nucleatum* aumentaba (24). La diversidad bacteriana en la cavidad oral se estima en más de 700 especies y filotipos diferentes, que pertenecen a nueve; *Deferribacterias*, *Espiroquetas*, *Fusobacterias*, *Actinobacterias*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Streptococcus*, *Proteobacteria* y dos sin miembros cultivables; OP11 y TM7 (25).

1.4 *Streptococcus mutans* y su importancia en la placa oral:

Streptococcus mutans es uno de los agentes etiológico primarios de la caries humana y una de las propiedades de virulencia importantes de este organismo es su capacidad para formar BM dental (26). De acuerdo a lo expresado por Ojeda y su grupo (2013) es un coco Gram-positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativa, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Es un organismo fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido (27). Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas” (28). Esta especie bacteriana se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. Su hábitat natural es la cavidad oral. En ella las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas (29). Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. (30)

Una característica importante en el proceso infeccioso de este microorganismo es la capacidad de fermentar la sacarosa y producir ácidos que cambian el pH del esmalte dental (27). Según lo publicado por Ajdić et al.; (2010) expresan “que dentro de su genoma se encuentra una variedad de genes” que le permiten metabolizar una gran variedad de carbohidratos que cualquier otro organismo Gram-positivo (31). Además de azúcares, esta bacteria es capaz de convertir varios alcoholes de azúcar en intermediarios glucolíticos, y los genes para el metabolismo de manitol y sorbitol (glucitol) también están presentes. Entre los grupos de genes recientemente identificados se encuentra uno responsable de la síntesis y degradación del almidón que incluye pulanasa, dos enzimas pentosa-fosfato ribosa-fosfato epimerasa (rpe) y ribosa-fosfato isomerasa (rpiA). Además, se descubrió la

presencia de un transportador del sistema fosfotransferasa (PTS) para pentosa (posible ribulosa), lo que sugiere que *Streptococcus mutans* es capaz de sintetizar y usar ciertas pentosas (31 y 32).

La fermentación de carbohidratos es la principal vía de producción de energía que presenta *Streptococcus mutans*, esto se debe igual por la presencia de algunas enzimas como piruvato deshidrogenasa, piruvato formiato-liasa (la equivalente anaeróbica de piruvato deshidrogenasa), fosfotransacetilasa, acetato cinasa, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y una acetoina deshidrogenasa recientemente identificada (32). Lo que nos permite determinar que la principal vía catalítica de carbohidratos y respiración celulares anaeróbica. Sin embargo, un grupo importante de enzimas en si proceso patogénico es la glucosiltransferasa encargadas de participar en la formación de la BM.

1.5 Glucosiltransferasas:

Glucosiltransferasas es un grupo de enzimas que hidrolizan la sacarosa, pero transfieren el resto de glucosa a un polímero conocido como glucano (33). En la naturaleza se encuentran varios tipos de estos polisacáridos bacterianos diferenciados estructuralmente en su enlace básico, cantidad de ramificación y peso molecular. El primer glucano identificado tenía un enlace de núcleo que consiste en un enlace α 1-6 que lo clasificaba como un dextrano (figura 4). Más tarde, se identificó un glucano único que tenía un enlace de núcleo α (1-3) y se le dio el nombre mutano. *Streptococcus mutans* tiene también enzimas que dividen la sacarosa y transfieren la fracción de fructosa a un polímero de fructosa conocido como fructano. En la mucosa oral existen otras bacterias que forman algunos de estos polímeros, pero solo *Streptococcus mutans* forma todos (33). Una serie de experimentos in vitro demostraron que los glucanos permiten que *Streptococcus mutans* se adhiera a la superficie (27). Esto sugirió que a nivel *in vivo* estos polímeros permitan a la bacteria

acumularse sobre la superficie del diente e impedir el proceso de mineralización alterando la superficie de este (28).

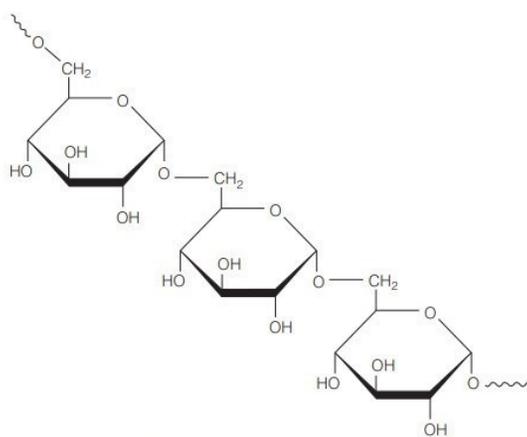


Figura 4: Molécula de Dextrano enlace α 1-6 glucosa, principal exopolisacaridos de la biopelícula oral.

Núñez et al., (2010) describen el proceso cariogénico a nivel químico y puede resumirse de la siguiente manera: inicialmente tiene lugar la fase de producción de ácido, en la cual las bacterias acidogénicas y acidúricas de la BM fermentan los carbohidratos ingeridos, con lo que producen ácidos orgánicos (34). Estos ácidos se difunden hacia el esmalte la dentinao el cemento, y van disolviendo parcialmente los cristales de dichos tejidos cuya estructura está compuesta por hidroxiapatita provocando la disminución los niveles de pH de la placa incluso que descienda por debajo de los niveles conocidos como pH crítico, que van de 6,5 a 6,7 en dentina y cemento y de 5,3 a 5,7 a nivel de esmalte, en estos niveles los cristales de las estructuras dentales se disocian, liberando iones como calcio y fosfato; estos iones se difunden hacia la placa y la saliva, proceso que se conoce como «desmineralización» (34, 35, 36).

La desmineralización comienza a nivel atómico en la superficie de los cristales en el interior del esmalte o la dentina, y de no ser detenida, continua y formar microcavidades en la estructura del diente. La duración de la desmineralización depende del tiempo (37). Para

que el pH regrese a sus valores normales por encima de un pH crítico, la cantidad de saliva controla este proceso mediante su composición y capacidad amortiguadora (38). Permitiendo que se una nuevamente iones de calcio y fosfato a la superficie desmineralizada, permitiendo el proceso de remineralización. Esta actividad permite la reparación de la lesión sobre la superficie dental, también el calcio, el fosfato y fluoruro proveniente de la saliva reconstruyen la nueva superficie del cristal. Sin embargo, cuando este proceso se altera va incidir en el deterioro del diente y desarrollo de lesiones (Figura 5).



Figura 5: Corona de un Diente molar donde se observa caries y destrucción de la dentina.

Actualmente para evitar el deterioro de la placa dental se debe reforzar la estructura del diente mediante el uso de flúor de sodio en gel, este procedimiento se hace después de los 3 años hasta los 13 años, cada 6 meses (40). Sin embargo, esta práctica no es muy difundida en la población, lo que disminuye la protección dental. Además, es importante destacar que la caries es una enfermedad multifactorial y por tanto varios factores contribuyen a su desarrollo y no solo la protección o no con sustancias químicas. Uno es la carga microbiana, segunda la dieta consumida (cantidad de carbohidratos en el día), tercero factores propios del huésped (cantidad de dientes, enfermedades asociadas como obesidad- diabetes, embarazo entre otras), cuarto el tiempo. Estos factores deben estar presentes, pero también deben interactuar con condiciones óptimas del hospedero como

tejidos susceptibles, presentar un microbiota con potencial cariogénico, consumo frecuente de una dieta rica en sacarosa, que influirán en el desarrollo de placa dental (41). También hay factores secundarios que pueden determinar la presencia de algunos microorganismos patógenos como la saliva, exposición al flúor, higiene oral. (42).

1.6 Fitoterapia una nueva alternativa de tratamiento medicinal:

Actualmente los productos naturales se han investigados más a fondo como agentes prometedores para la prevención de enfermedades orales, especialmente enfermedades relacionadas con la placa, como la caries dental (43, 44). De acuerdo a los expresado por Fine et al.; (2000) el aumento de la resistencia a los antimicrobianos disponibles ha atraído la atención de la comunidad científica con respecto a la búsqueda de nuevas drogas costo-efectivas de origen natural o sintético (45). Algunos estudios han señalado la eficacia de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos de plantas en el control del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* y otras bacterias orales. Varios estudios han confirmado el potencial inhibitorio de aceites esenciales algunas plantas de consumo humano como la vid, el ajo, manzanilla, menta e incluso de uso industrial como *Eucalipto radiata*. Duarte et al., (2016) determinó la actividad anti quorum sensing del aceite esencial de *Eucalyptus radiata* y *globolus* en bacterias orales (46). En el año 2012 Chaudari et al.; evaluaron la acción bactericida del aceite esencial sobre 47). Goldebeck et al., (2014) comprobaron la actividad bactericida del aceite esencial de *Eucalypto globolus* y *Eucalypto urograndis* en células platónicas y de la BM, experimentalmente comprobaron una eficaz y rápida acción (15 y 50 min respectivamente) de los aceites esenciales extraídos y el control positivo con respecto a la inhibición de viabilidad celular mediante el uso de resazurina (48).

1.7 *Eucalyptus globulus* Labill:

Eucalyptus globulus Labill pertenece a la familia de *Myrtaceae*. Se ha informado sus propiedades antisépticas, astringente, desodorante, diaforético, expectorante, febrífugo, repelente de insectos, rubefaciente. El eucalipto azul es un remedio popular para abscesos, artritis, asma, bronquitis, quemaduras, tos, fiebre, gripe, inflamación, lepra, malaria, llagas, dolor de garganta y heridas (49,50). Se sugiere la presencia de algunos productos naturales en el aceite esencial como monoterpenos y sesquiterpenos (1,8-Cineol o Eucaliptol, Limoneno, α -Pinenol, Guaiol, Terpinen-4, Linalol, α -Terpineol, β -Mirceno y α -Terpineno (51), en extractos alcohólicos (etanol y metanol) y orgánicos (hexano) se han determinado una gran cantidad de flavonoides, taninos y cumarinas de este árbol que influyen en el crecimiento de varias bacterias patógenas (*staphylococcus aureus*, *Pseudomona aureginosa* y *Eschericha coli*) y levaduras como *Candida albicans* (52). Sin embargo, el uso de aceites esenciales en el tratamiento de la caries dental a partir de *Eucalypto* ha sido bastante descrito, pero es importante resaltar que estos compuestos en algunos casos pueden producir sensación de ardor, enrojecimiento de la zona y en altas concentraciones quemaduras de la mucosa (Figura 6) es así como se requiere la utilización de solventes que permitan la precipitación de estos compuestos naturales sin producir alteraciones en los tejidos del paciente (53).



Figura 6: Quemadura en la mucosa bucal por altas concentraciones de aceites esenciales.

1.8 Productos naturales:

Los productos naturales son componentes activos originados a partir de metabolitos primarios presentes en las plantas y no esenciales en la sobrevivencia, presentado un rol ecológico (polinización y defensa) y un alto valor farmacológico. En la actualidad son punto de investigación por presentarse algunos de estos compuestos como potenciales agentes terapéuticos en el control del crecimiento bacteriano e inhibición de la biopelícula oral.

1.8.1. Alcaloides: son un grupo de sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza presenta una gran actividad toxica contra innumerables organismos, incluidos las bacterias. Su principal mecanismo de acción es intercalarse entre la molécula de ADN y la pared celular (51). Se ha demostrado la actividad inhibitoria in vitro de varias plantas que poseen estos metabolitos contra bacterias patógenas de la cavidad oral entre ellas *Streptococcus mutans*. También existen estudios donde se evidenciaron sus propiedades antiinflamatorias en enfermedades orales y antioxidantes en algunas líneas celulares (52)

1.8.2. Fenoles: son compuestos importantes en la planta ya que da el color distintivo de algunas semillas o flores, se caracterizan por ser un grupo diverso de compuestos (flavonoides, antocianinas, taninos entre otros). A nivel biológico son compuestos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y algunos estudios indican su actividad anticancerígena (53). A nivel in vitro se evaluó su efectividad contra la proliferación celular de *S. mutans*, específicamente al inhibir la acción de las glucosiltransferasas y por tanto evitar el desarrollo de células plantónicas y formación de biopelícula (54).

1.8.3. Saponinas: son un conjunto de compuestos caracterizados por dar sabor amargo a algunas semillas, con un alto aporte nutricional a nivel humano. Se caracterizan a nivel biológico por sus propiedades antitumorales, antimicrobianas y fungicida (55). Son un grupo que se caracteriza porque químicamente son glúcidos triterpenicos que se caracterizan por permitir la formación de espuma en soluciones acuosas (56)

1.8.4. Cumarinas: son un grupo de metabolitos secundarios derivados de la ruta del shikimato-corismato caracterizado por su actividad anticancerígena, antiinflamatoria y también antifúngica y antibacteriana (57).

De acuerdo a lo expresado anteriormente con respecto al uso de productos naturales y su uso en la prevención de enfermedades orales, el presente trabajo desea investigar la acción de componentes naturales, obtenidos mediante solventes que no induzcan daño a las células de la mucosa y por tanto a futuro puedan ser una herramienta en la preparación de diferentes productos orales de uso seguro. Es así como se propone las siguientes hipótesis:

1.9 Hipótesis:

Hipotesis verdadera: El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* disminuye la formación de la estructura tipo biopelícula mediante la inhibición de la actividad glucosiltransferasa en *Streptococcus mutans*.

Hipotesis alternativa: El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* no altera la formación de la estructura tipo biopelícula mediante la inhibición de la actividad glucosiltransferasa en *Streptococcus mutans*.

1.10 Objetivos:

1.10.1 General:

Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Eucalyptus globulus* sobre la formación de biopelícula de *Streptococcus mutans*; y su potencial acción preventiva del desarrollo de placa bacteriana.

1.10.2 Específicos:

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- Evaluar la capacidad inhibitoria en la formación de la biopelícula del extracto hidroalcohólico a nivel *in vitro*.
- Determinar el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* sobre la actividad enzimática de glucosiltransferasa en *Streptococcus mutans*

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Preparación del extracto vegetal:

El extracto vegetal se preparó en el laboratorio de Química de la Universidad Adventista de Chile. El material vegetal se recolectó en la época de otoño en el sector de las Mariposas, Chillán, Chile(36°38'12"S 71°59'42"W.). Las hojas se secaron a ± 23 °C durante 8 días en un lugar cubierto y humedad relativa de $\pm 60\%$, después se trituraron manualmente. 200 g de hojas molidas se dispusieron en envases de vidrio, conjuntamente con 1000 mL de agua y 1000 mL etanol al 95% marca Merck, se dejó macerar por 48 horas en oscuridad y a una temperatura promedio de 20°C. Luego se filtró a temperatura ambiente en una bomba al vacío (Arquimed) con embudo buchner y papel filtro 150 mm (Whatman).

2.2 Fraccionamiento del extracto vegetal:

Se tomaron 200 mL de extracto crudo y se concentró con el rotavapor (Cole-Parmer) condensador de bobina vertical a 60°C, a partir del extracto hidroalcohólico se usaron otros solventes de diferente polaridad para la separar los distintos componentes naturales bioactivos: hexano (SIGMA), acetato/cloroformo (MERCK) y agua. El fraccionamiento se realizó mediante un embudo de separación, se adicionó primero 100mL de hexano a 100mL del extracto hidroalcohólico, se agito varias para homogenizar, se dejó en reposo y por decantación se obtuvieron las dos fases separándose por densidad la fracción de hexano (esto se realizó 3 veces), posteriormente la fase que no poseía hexano se le agregó acetato/cloroformo y se siguió la misma metodología, y por último se agregó agua, cada una de las fracciones obtenidos se concentraron en el rotavapor a 50°C y se guardaron para su posterior uso.

2.3 Pruebas fitoquímicas:

Se realizó un análisis fitoquímico a partir del extracto hidroalcohólico y las fracciones obtenidas con reactivos de coloración para una identificación cualitativa de los metabolitos secundarios más representativos basados en metodologías propuestas por Jamilk et al., (2017), Gruszycki et al.; (2019), Bulugahapitiya (2013)

2.3.1 Alcaloides: Para la determinación de alcaloides, se utilizó el método descrito por Jamilk y colaboradores (2017), a 1 mL de extracto se agregan unas 3 gotas de ácido pícrico concentrado, es indicativa la presencia de estas sustancias un precipitado de color amarillo (57).

2.3.2 Fenoles o Taninos: Para la determinación de fenoles o taninos, se utilizó el método descrito por Gruszycki et al.; (2019) 0,5 mL de extracto se le agregaron 3 gotas de solución etanólica y cloruro férrico al 5%, la presencia de taninos se determinó por una coloración azul verdosa y rojiza es presencia de fenoles (58).

2.3.3 Flavonoides: Se evidencio la presencia de flavonoides mediante el método descrito Gruszycki et al.; (2019) prueba de Shinoda donde al extracto se agregó un trocito de viruta de magnesio amalgamado y cinco gotas de ácido clorhídrico concentrado (MERCK) se agito y dejo en reposo, positivo para colores del amarillo al rojo (58)

2.3.4 Saponinas: Para la determinación de este metabolito se realizó el ensayo de espuma donde se agita fuertemente en vortex (REMI) 2 mL de extracto por 30 segundos y se deja en reposo por 15 min, si la altura es menor a 5mm es negativo, se considera positivo si la

muestra forma espuma que mida más de 5mm y se mantengan transcurrido este tiempo (59)

2.3.5 Cumarinas: Para determinar la presencia de estos compuestos se realizó una cromatografía en cromatoplasmas (Aldrich) con fase estacionaria de sílica gel, con dimensiones de 4 cm de ancho x 8 cm de largo, la fase móvil era Tolueno-Acetato de etilo (MERK) en concentración 8:1, después se observa en luz ultravioleta por medio de una ampolla de onda larga 365 nm dentro de una cámara de bioseguridad, la presencia de cumarinas se evidencia por la aparición de manchas color violeta (59).

2.4 Cultivo de cepa Bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC 35668:

Para la multiplicación de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 35668 procedente de lab-diagnostic, se usó el medio de cultivo BHI (BD) con agar sangre y se incubó a 37°C en estufa de cultivo (Arquimed) con control atmosférico (CO₂) por 48 horas para que aparecieran las colonias, estas se caracterizan por ser lisas y de un color amarillo cremoso (55).

2.5 Determinación de concentración mínima inhibitoria:

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se siguió la metodología reportada por Tovalino y Contreras (2010), se inoculó 20 µL de 1x10⁻⁵ UFC/mL de cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en 10 mL de medio BHI BD y las diferentes concentraciones de extractos de hojas de *Eucalyptus globulus* 5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/mL; el control positivo fue el medio BHI inoculado solo con bacterias. Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 ° C en las mismas condiciones del numeral 2,4; se cuantificó densidad óptica mediante el uso del espectrofotómetro UV-Vis (SHIMADZU UV-1900) a 590 nm. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se tomaron 10 µL de muestra de cada

tubo de ensayo y se adiciono sobre una placa de Petri que poseía medio solido BHI, y se inoculo por 24 horas a 37 °C, CMI se asignó a la concentración más baja de extracto de hidroalcohólico que impidió el crecimiento bacteriano en comparación al control.

Se determino el porcentaje inhibitorio de las fracciones, pero directamente en medio solido BHI, se inoculó 20 µL de 1×10^5 UFC/mL de cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y se adiciono en el medio de cultivo con la punta de una micropipeta 1µL de cada fracción, se usó como control positivo sensidiscos de amoxicilina de 10 µg y control negativo agua, se inoculo por 24 horas a 37 °C en estufa de cultivo. El porcentaje de inhibición se calculó restando el halo de inbición de cada fracción y el halo del control positivo, dividido el halo de inhibición del control positivo menos el control negativo multiplicado por 100.

(±

2.6 Ensayo de formación de Biopelícula en placas de polietileno

Se realizó un cultivo bacteriano en agar por 24 horas a 37°C, después se tomó una muestra y se inoculo en 10 mL de caldo por 24 horas a 37°C. Se realizó una dilución de 1:50 en medio fresco, se tomó una alícuota de 10 µL y se agregó en medio fresco BHI suplementado con 4% de sacarosa y las diferentes concentraciones del extracto, en pocillos de polietileno por 72 horas. Luego se descartó el sobrenadante y se lavó cada pocillo con buffer fosfato. Se agregó 200µl de Etanol al 95% por una hora. Se secaron a temperatura ambiente por 24 horas y se tiñó con cristal violeta al 1% por 35 min. Se lavó con agua destilada y se secaron al aire libre. Posteriormente se añadió 100µL de solución etanol:acetona a las microplacas y se midió densidad óptica a 630 nm en espectofotometro UV-Vis.

2.7 Actividad Enzimática

Para evaluar la actividad de las glucosiltrasnfersa se siguió la metodología propuesta por Schilling y Bowen (1992), se inoculo la cepa bacteriana en medio de cultivo BHI con 4% de

sacarosa y las diferentes concentraciones del extracto por 24 horas a 37°C. Para la reacción enzimática se agregó 300 µL de acetato de sodio (MERCK), 150 µL de Medio crudo, 5% de sacarosa y 50 µL de fosfato de potasio (SIGMA). Se incubo nuevamente a 37°C y 2% CO₂ por 2 horas. Después se agregó 1 mL de Etanol al 95% para precipitar los glucanos insolubles, se centrifugo por 10.000 g por 5 min. Los Glucanos se hidrolizaron y con 300 µL de HCl 1M por 30 min, luego se neutralizaron con 300 µL NaOH 1M. Para cuantificar se realizó la prueba de fenol ácido sulfúrico, en espectrofotómetro UV-Vis a una absorbancia de 600 nm (33).

2.8 Análisis estadístico:

Para realizar el análisis estadístico de los datos de las variables cuantitativas, se aplicó ANOVA, análisis comparativo de Dunnett's, y test de Fischer. El nivel de confianza fue del 95% ($p=0,05$) para la significancia. Para realizar el análisis se usaron los programas estadísticos GraphPad Prism 5.00 y Statgraphics Centurion XVIII. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

3 Resultados

3.1 Identificación cualitativa de productos naturales:

En el presente estudio se determinó la presencia de productos naturales metabolitos de uso terapéutico en el tratamiento de algunas patologías orales, mediante técnicas colorimétricas descrita en la siguiente tabla:

Tabla 1: Identificación cualitativa de algunos productos naturales de *Eucalyptus globulus*

Fracción \ Producto Nat.	Extracto Hidroalcohólico	Hexano	Cloroformo/ Acetato	Agua
Alcaloides	+	-	++	-
Fenoles o Taninos	++*	+**	-	+**
Flavonoides	+	+	-	+
Cumarinas	+	+	-	-
Saponinas	+	+	-	+

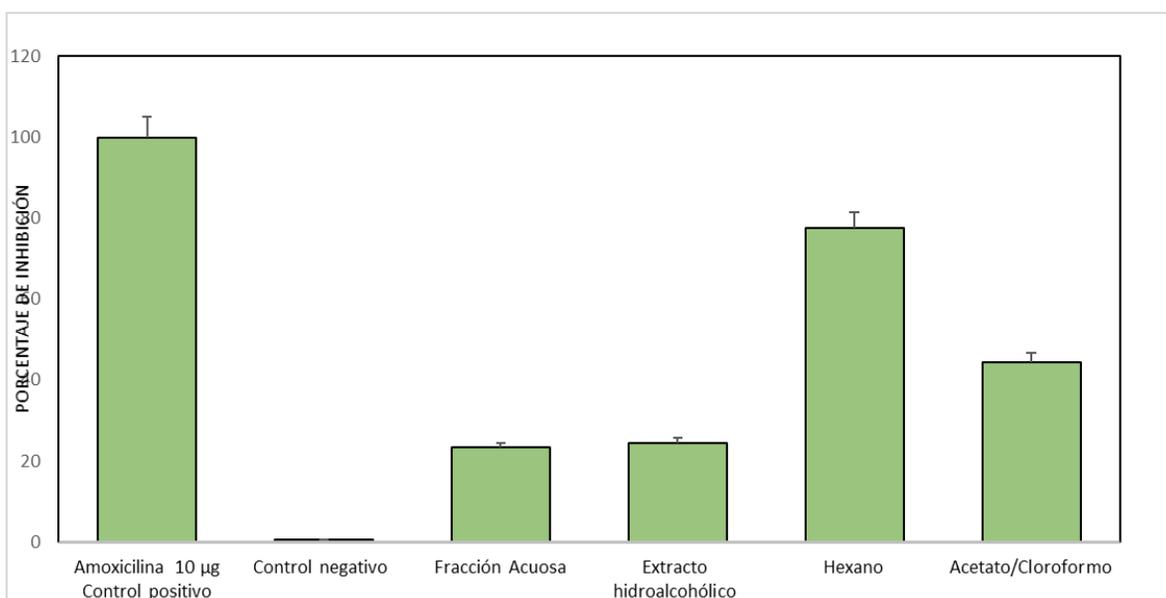
+ (Presente). ++ (Abundante), - (Ausente)

* Taninos

** Fenoles

Podemos observar que la tabla 1 de acuerdo a la capacidad de extracción de cada uno de los solventes según la polaridad, se visualiza una mayor presencia de componentes activos en los solventes polares (extracto hidroalcohólico, agua y hexano) y menor en los solventes apolares como el acetato/cloroformo. Los resultados, evidencian la presencia de flavonoides, fenoles, taninos cumarinas y saponinas en tres de las fracciones utilizadas, y solamente alcaloides en la fracción de cloroformo/acetato. Sin embargo, se destaca la presencia de alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, cumarinas y saponinas en la fracción de extracto hidroalcohólico, seguido de hexano diferenciándose en la ausencia de

alcaloides en esta última y una mayor cantidad de taninos. En la fracción de agua se evidenció la presencia de fenoles, flavonoides y cumarinas. Esto concuerda con los resultados presentados en el trabajo de Luís et al.; (2016), donde se demostró que las fracciones obtenidas a partir de diferentes solventes (hexano, etanol y agua) precipitaban diferentes productos naturales con una alta actividad antimicrobiana (46). Por tanto, se corrobora la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico y las distintas fracciones.

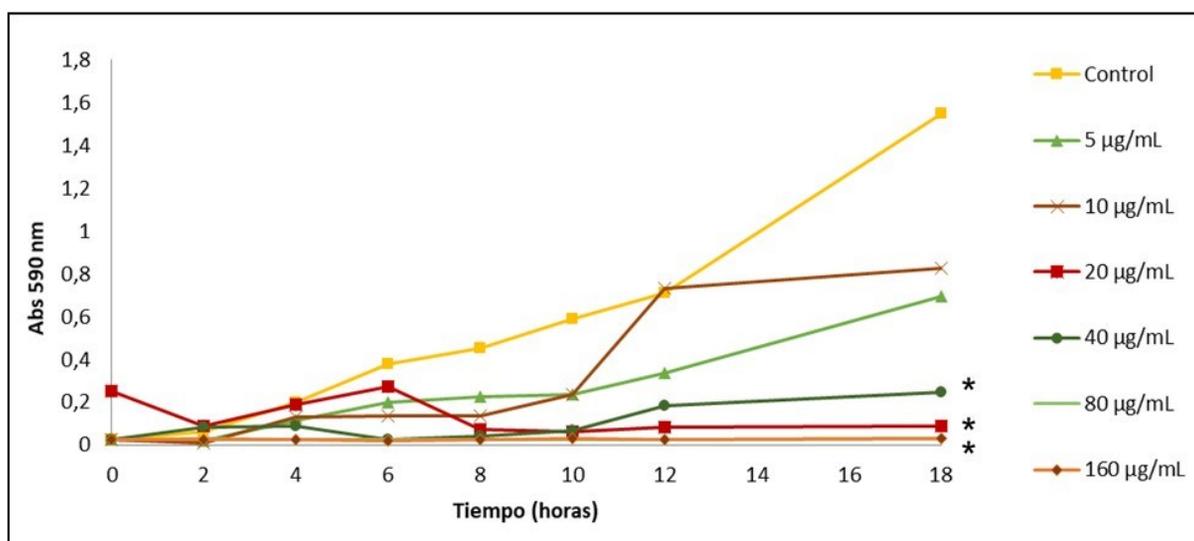


Grafica 1: Porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones provenientes del extracto hidroalcohólico contra el crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* ($p \geq 0,005$, con respecto al control negativo)

3.2 Inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* por las diferentes fracciones del extracto

Luego de verificar los componentes en las diferentes fracciones se procedió a utilizarlas en ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* para verificar la viabilidad de los componentes naturales y su actividad antimicrobiana. Sin

embargo, no se determinó la concentración de ellas. Se evidenció la actividad antimicrobiana de las fracciones, donde los componentes activos extraídos a partir de hexano presentaron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* con respecto a las otros solventes. Sin embargo, esta se diferenció significativamente con respecto al control positivo con 10 ug de amoxicilina, un conocido inhibidor de *Streptococcus mutans* (Grafica 1). Los componentes activos presentes en las fracciones cloroformo/acetato y extracto acuoso también presentaron una diferencia significativa con respecto al control positivo y las fracciones de hexano y extracto hidroalcohólico (valor de $p=0,0001$).



Grafica 2: Inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* por diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* ($p \geq 0,005$, con respecto al control) * concentraciones que presentan una mayor diferencia significativa con respecto al control.

3.3 Inhibición de *Streptococcus mutans* por el extracto hidroalcohólico con respecto al tiempo:

Una vez determinado la inhibición de *Streptococcus mutans* agente primario de la formación de la placa bacteriana dental, parte de la fracción hidroalcohólica, se procedió a realizar una curva dosis-respuesta del crecimiento del microorganismo. En el grafico 2 se visualiza la

inhibición de las diferentes concentraciones del extracto de hidroalcohólico de *Eucalypto globolus* con respecto a la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC35668 en un tiempo de 24 horas mediante la cuantificación de la densidad óptica, Se observó una diferencia significativa del grupo control con respecto a las concentraciones mayores a 20 $\mu\text{g/mL}$ (0,344; $p \leq 0,005$); y no se evidencio diferencias significativas con fracciones menores a 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (0,215, 0,1636, $p \leq 0,005$). Con respecto a las concentraciones de extracto de 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$ se observó una reducción muy significativa en el crecimiento. Por tanto, la concentración mínima inhibitoria del extracto se encuentra en 20 $\mu\text{g/mL}$.

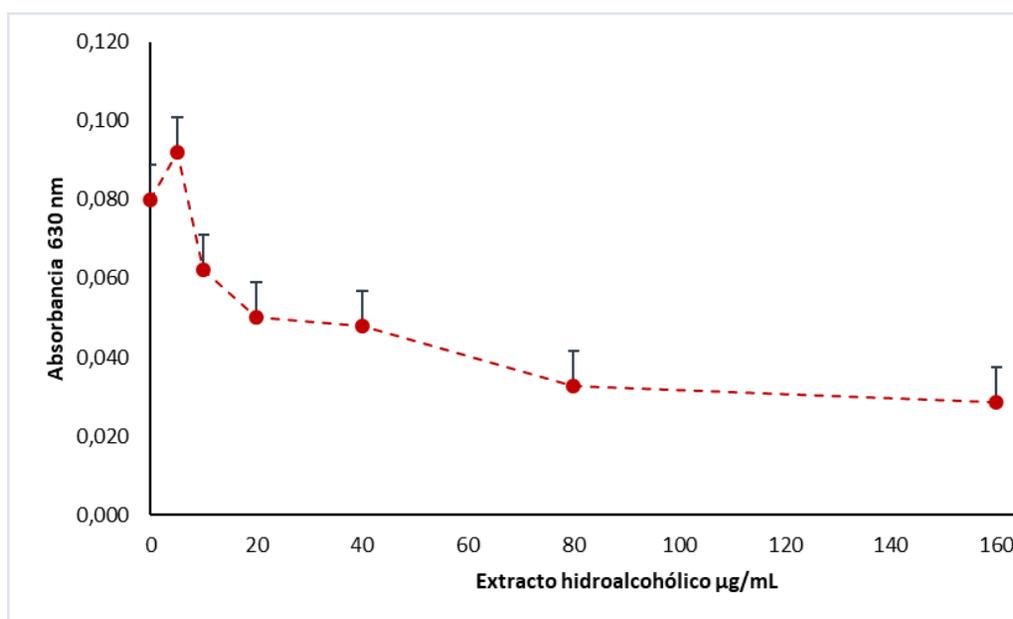


Gráfico 3: Inhibición en la formación de biopelícula de *Streptococcus mutans* por diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globolus*, ($p \geq 0,005$, con respecto al control)

3.4 Inhibición en la formación de Biopelícula *Streptococcus mutans*:

Streptococcus mutans se caracteriza por ser un microorganismo patógeno formador de biopelícula, este proceso aumenta a medida que se acelera el crecimiento microbiano permitiendo la adherencia del microorganismo a una superficie. Al evaluar la acción del extracto hidroalcohólico en la formación de la biopelícula de *Streptococcus mutans* sobre

una superficie inerte (Grafica 3), se mostró diferencias al aumentar la concentración de extracto sobre 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\leq 0, 2,266$; $p=0,05$) con respecto al control; sin embargo, entre ellas no existe diferencias muy significativas. Al comparar las concentraciones mayores del extracto *in vitro* y con el uso de colorante cristal violeta, se puede evidenciar que la concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye cualitativamente la síntesis de biopelícula por parte de este microorganismo observándose poca coloración, y al cuantificar densidad óptica (DO) se observó un valor muy cerca de cero ($\text{DO}\pm 0,01$, $p=0,005$) en comparación con 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde todavía se pueden observar un valor más alto de bacterias unidas a una superficie inerte. Sin embargo, el control y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaban coloración violeta y al cuantificar en el espectrofotómetro se observó que no existían diferencias significativas entre estas (valor DO $\pm 0,06$ y $0,08$ respectivamente)

3.5 Evaluación de la producción de Glucano por *Streptococcus mutans* ante la presencia de diferentes concentraciones del Extracto hidroalcohólico de *Eucalypto globulus*:

Para formar la biopelícula *Streptococcus mutans* sintetiza Glucano (Exopolisacaridos) mediado por la acción de las glucosiltransferasas. Se inoculó la bacteria con diferentes concentraciones del extracto para visualizar la inhibición enzimática en la disminución en la producción de Glucano. De acuerdo a los datos obtenidos para la producción de glucano por parte de la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* en presencia de 5% de Sacarosa y las diferentes concentraciones del extracto, se evidencian diferencias muy significativas en concentraciones mayores a 40, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al control (1,658; 2,266 y 2,495 respectivamente, $p=0,005$) en la producción de glucano, sin embargo, a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se evidencia diferencia en la síntesis de glucano por parte de los microorganismos inoculados sin extracto (figura 4).

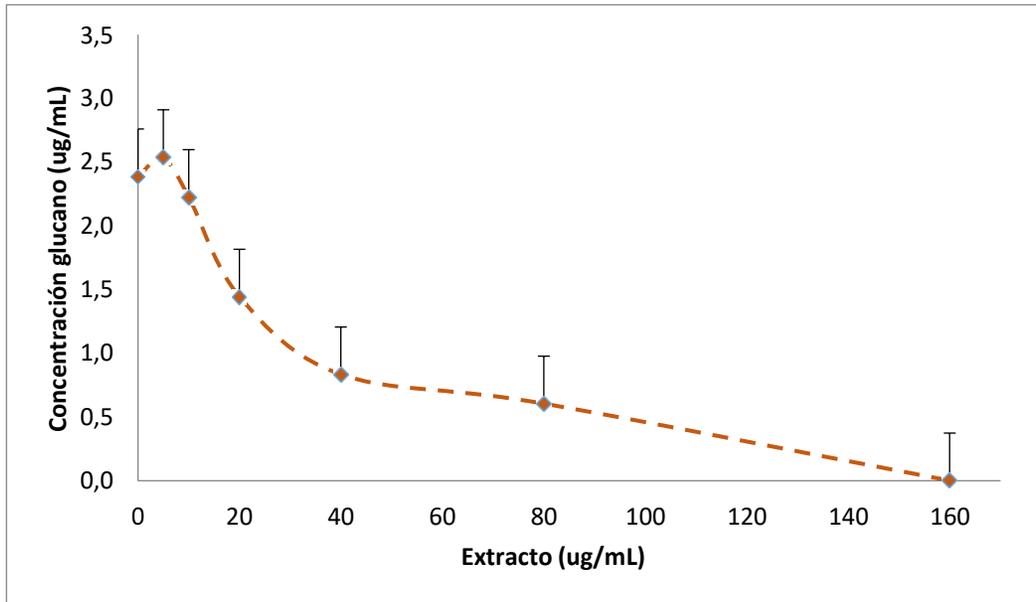


Gráfico 4: Cuantificación de la producción de Glucano por *Streptococcus mutans* contra diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*. Las medias que presenta una diferencia significativa con respecto al grupo control presentan un asterisco ($p \geq 0,005$, con respecto al control)

4 Discusión

En la actualidad las acciones más usadas para su control de la biopelícula y microorganismo oralesl es el uso de antibióticos o compuestos químicos, sin embargo, estos presentan toxicidad y una baja efectividad. El uso de plantas que inhiban su crecimiento es una nueva herramienta que facilita su control. *Eucalypto globolus* es un árbol que presenta propiedades medicinales, su aceite esencial es antimicrobiano. Por tanto, la finalidad del presente estudio es evaluar a nivel *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico sobre el crecimiento y formación de biopelícula de *Streptococcus mutans*.

Según lo reportado por Goldbeck et al., (2014) el *Eucalypto globolus* se caracteriza por presentar varios productos que permiten el control e inhibición del crecimiento de varias especies patógenas entre ellas bacterias Gram positivas al alterar algunas moléculas importantes en la dinámica celular como lípidos de membrana o proteínas presentes en algunos procesos celulares (58). Sin embargo, estos productos se obtienen de acuerdo a sus propiedades químicas moleculares, mediante la polaridad de cada uno de los solventes usados en el proceso de extracción permitiendo determinar de manera general algunos de ellos. Según Gruszycki, et al., (59) los Fenoles se caracterizan por ser compuestos que se precipitan con alcoholes como el metanol. Debido a la capacidad de este de inhibir la acción del polifenol oxidasa que causa la oxidación de los polifenoles, por tanto, permite la unión de estos compuestos. Los taninos en cambio se precipitan con hexano por su estructura química de alto peso molecular que hacen que sean menos polares (55). Los flavonoides se caracterizan por ser difenilpropanos muy diversos y abundantes en las plantas. Las diferencias con respecto presencia de estos compuestos en tres fracciones (hidroalcohólico, hexano y agua) se debe a su estado en la naturaleza; pueden estar unidos con azúcares formando compuestos heterósidos permitiendo su precipitación con solventes

polares (hidroalcohólico y agua). Cuando están en forma libres o agliconicos se precipitan en compuestos no polares como el hexano (60). Finalmente, las saponinas se caracterizan por ser moléculas de alto peso y presentar residuos de monosacáridos unidos a su molécula y estos glúcidos son los responsables de producir espuma, pero también que se puedan extraer estos productos con solvente polares o hexano (60).

Con respecto la inhibición del crecimiento se pudo deducir que la fracción de hexano inhibe posiblemente al arrastrar una gran cantidad de compuestos fenólicos. Según lo reportado por Xiang et al., (2016) se ha evidenciado la susceptibilidad de las bacterias Gram positivas a estos compuestos, y a nivel celular se ha determinado que produce alteración de la estructura de la membrana, inhiben la replicación del ADN y alteran síntesis de proteínas (61). Las otras fracciones presentaron halos de inhibición menor con respecto al hexano (anexo A1) y al antibiótico de uso comercial, posiblemente la concentración de los diferentes compuestos naturales provenientes del *Eucalypto* era bajo para poder inhibir el crecimiento bacteriano.

Se ha evidenciado en algunos estudios la alta eficiencia en la inhibición en el crecimiento de *Streptococcus mutans* de extractos metanolitos de *Eucalypto globolus* en comparación con algunos antibióticos como gentamicina y nistatina, es debido a la presencia de quinonas como jungona y regionola (62). Luis A. et al., (2016) asegura que en parte su alta actividad antimicrobiana es por la presencia de flavonoides y el glóbulol un sesquiterpenos presente en el género de esta planta (63). Un estudio realizado por Banaver et al.; (2017) demostró que el extracto alcohólico de hojas de esta planta en concentración de 1024µg/mL inhibía el crecimiento de algunos microorganismos cariogenicos incluido *Streptococcus mutans* (64). Por tanto, podemos deducir que el extracto hidroalcohólico usado en nuestro estudio inhibió aún más el crecimiento de este microorganismo con una concentración mucho

menor (160 µg/mL), y es así como podría ser una alternativa en la fabricación de algunos productos de uso oral (cremas, enjuagues bucales y chicles) de alta actividad antimicrobiana.

Una característica importante y factor de patogenicidad de *Streptococcus mutans* es la formación de la biopelícula que permite inducir un ambiente ácido, con una alta fuente de carbohidratos disponibles, absorción de agua y otros nutrientes (18). Estas biopelículas se forman por glucano insoluble mediado por la glucosiltransferasas en condiciones donde exista una concentración óptima de sacarosa. Según Krzyściak et al., las glucosiltransferasas son necesarias para la adhesión al esmalte dental y la formación de agregados celulares por parte de los microorganismos, también se ha evidenciado la afinidad que existe de estas enzimas con la hidroxiapatita componente importante en la formación de la estructura del diente influyen en el proceso de remineralización; también presentan una alta afinidad con la lisozima y amilasa a partir de un dominio hidrofóbico permitiendo aún más la formación de la biopelícula (65). Las glucosiltransferasas también tiene la capacidad de permitir la unión de otros microorganismos incluso si estos no sintetizan este tipo de moléculas, esta cooperación permite la construcción de una placa fuerte adherida al diente y generando enlaces estables con los componentes de la pared celular de las células bacterianas.

Un estudio realizado por Paschoal et al., (2013) demostró que el extracto de Curcuma inhibía la liberación de glucosiltransferasa y por tanto se alteraba la estructura de la placa, mediante ensayos de microscopía electrónica demostraron que las uniones entre los EPS eran más débiles a medida que aumenta la concentración del extracto vegetal; también evidenciaron que el sistema cuórum sensing (CS) era afectado (66). El sistema cuórum también participa en la formación de biopelículas, mediante la liberación de algunos péptidos, por ejemplo, el péptido estimulante de competencia, este al liberarse cuando

aumenta la densidad celular se une a la histidina quinasa permitiendo la respuesta de transcripción de algunas proteínas, se demostró que en presencia de cúrcuma y clorhexidina se inhibía este proceso, disminuyendo la formación de exopolisacaridos y actividad glucosiltransferasa (67). Para apoyar esta actividad inhibitoria de algunos productos naturales como los presentado en la cúrcuma y *Eucalypto globolus* se propone el uso de la técnica de análisis morfométrico de Tahsil Nanded, para observar los cambios específicos que se dan en la superficie dental a nivel *in vivo* e *in vitro*.

Podríamos suponer, la presencia de algo producto natural en el extracto influyen en los enlaces débiles (covalente y fuerzas de Van der Waals) presentes en la unión de los exopolisacaridos con la membrana celular de los microorganismos formadores de biopelícula, impidiendo su unión y adherencia.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que los diferentes productos naturales presentes en el *Eucalypto globolus* disminuyen la actividad glucosiltransferasa, por tanto la formación de la biopelícula, factores esenciales en el proceso cariogénico de *Streptococcus mutans*, por tanto son una herramienta aplicativa en el control de este microorganismo y se presenta como una alternativa para la elaboración de algunos productos de uso oral (cremas, enjuagues dentales, entre otros) de menor costo y gran acción terapéutica. Este estudio además permite dar luces para estudios posteriores donde se puede determinar el tipo de inhibición enzimática, y con el uso de técnicas de análisis morfométrico observar la interacción célula bacteriana-exopolisacaridos y superficie del diente.

Proyecciones

En el futuro para complementar este estudio y visualizar la acción enzimática inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Eucalypto globolus* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la formación de la biopelícula se propone:

- Completar el objetivo experimental no terminado por contingencia covid 19, el cual consiste en determinar la actividad enzimática del compuesto común mediante un zimograma. Determinando la acción del producto natural específico sobre el sitio activo de la enzima o el sustrato impidiendo la formación del complejo enzima-sustrato.
- Mediante la extracción química identificar el componente puro presente en las fracciones, responsable de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, actividad de glucosiltransferasa y producción de Glucano formadores de biopelícula.
- Comparar diferentes concentraciones del producto estimando mediante cinética enzimática (Michaelis Menten y doble recíproco Lineweaver-Burk) los parámetros cinéticos del inhibidor.
- Realizar estudios *in vivo* sobre una superficie dental visualizando mediante microscopía electrónica por barrido la interacción del compuesto natural y la formación de biopelícula por parte de *Streptococcus mutans*.
- Innovar el proceso de extracción de compuestos naturales insolubles en agua mediante el uso de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES). Los NADES son disolventes biodegradables formados por metabolitos primarios de las plantas, líquidos a temperaturas bajo cero, presentando compatibilidad con otros componentes naturales mediante interacciones moleculares estables, maximizando el proceso de extracción y permitiendo la integridad de los compuestos naturales. Se sugiere la formulación de diferentes compuestos NADES (azúcares y alcoholes de azúcares) para la extracción de compuestos presentes en el *Eucalypto globolus* y su uso en la reacción enzimática del compuesto inhibitorio contra *Streptococcus mutans*.

5 Referencias Bibliográficas

1. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
2. Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology?. *The ISME journal*, 3(11), 1223-1230.
3. Shirliff, M., & Leid, J. G. (2009). *The role of biofilms in device-related infections (Vol. 2)*. New York: Springer.
4. Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5385-5394.
5. Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
6. Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2015). Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in microbiology*, 23(4), 233-242.
7. Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of bacteriology*, 195(24), 5540-5554.
8. Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS microbiology reviews*, 39(5), 649-669.
9. Lembre, P., Lorentz, C., & Di Martino, P. (2012). Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. In *The complex world of polysaccharides*. InTech.
10. Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161-172.

11. Argilagos, G. B., & Rodríguez-Torrens, H. (2010). Biofilms bacterianos versus antimicrobianos. Nutracéuticos: una opción promisoriosa (Artículo de revisión). *Revista de Producción Animal*, 22(1), 20-31.
12. Plančak, D., Musić, L., & Puhar, I. (2015). Quorum sensing of periodontal pathogens. *Acta stomatologica Croatica*, 49(3), 234.
13. Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.
14. Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., & Bassler, B. L. (2017). Surface-Attached Molecules Control *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing and Biofilm Development. *Nature Microbiology*, 2, 17080. <http://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.80>
15. Rice, S. A., Givskov, M., Steinberg, P., & Kjelleberg, S. (1999). Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 23-31.
16. Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., ... & Young, J. M. (2005). Bacterial communication (“quorum sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 417-423.
17. Shapiro, S., Giertsen, E., & Guggenheim, B. (2002). An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries research*, 36(2), 93-100.
18. Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2003). Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol 2000*, 3, 12-55.
19. Lang, N. P., Mombelli, A., Attström, R., Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2009). Parte 3: Microbiología. *Periodontología clínica e implantología odontológica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 1, 181.

20. Listgarten, M. A. (1976). Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man: a light and electron microscopic study. *Journal of periodontology*, 47(1), 1-18.
21. Zijngje, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., & Harmsen, H. J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*, 5(2), e9321.
22. Listgarten, M. A., Mao, R., & Robinson, P. J. (1976). Periodontal probing and the relationship of the probe tip to periodontal tissues. *Journal of periodontology*, 47(9), 511-533.
23. Palmer Jr, R. J., Gordon, S. M., Cisar, J. O., & Kolenbrander, P. E. (2003). Coaggregation-mediated interactions of *Streptococcus* and *Actinomyces* detected in initial human dental plaque. *Journal of bacteriology*, 185(11), 3400-3409.
24. Al-Ahmad, A., Wunder, A., Auschill, T. M., Follo, M., Braun, G., Hellwig, E., & Arweiler, N. B. (2007). The in vivo dynamics of *Streptococcus spp.*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella spp.* in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *Journal of Medical Microbiology*, 56(5), 681-687.
25. Wecke, J., Kersten, T., Madela, K., Moter, A., Göbel, U. B., Friedmann, A., & Bernimoulin, J. P. (2000). A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS microbiology letters*, 191(1), 95-101.
26. Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T., y Kuramitsu, HK (2005). La señalización basada en LuxS afecta la formación del biofilm de *Streptococcus mutans*. *Microbiología aplicada y ambiental* , 71 (5), 2372-2380.
27. Ojeda-Garcés, J. C., Oviedo-García, E., & Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* and dental caries. *Ces Odontología*, 26(1), 44-56.
28. Pérez Guevara, S. P. (2013). Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

29. Juca Pazmiño, A. E. (2016). Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de la *Stevia rebaudiana* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2016.).
30. Jawetz, E., Melnick, E. A., Joseph, L., Boyd, R. F. H., Bryan, G., ALLEN, S. D. J., ... & WOODS, W. C. (1985). Microbiología médica (No. 579.61). El Manual Moderno.
31. Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., ... & Lin, S. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(22), 14434-14439
32. Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews, 12(1-3), 125-147.
33. Schilling, K. M., & Bowen, W. H. (1992). Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infection and immunity, 60(1), 284-295.
34. Núñez, D. P., & García Bacallao, L. (2010). Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 9(2), 156-166
35. Matsui, R., & Cvitkovitch, D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. Future microbiology, 5(3), 403-417.
36. Zahradnik, R. T., Propas, D., & Moreno, E. C. (1977). In vitro enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the presence of salivary pellicles. Journal of dental research, 56(9), 1107-1110.
37. Mount, G. J. (2005). Defining, classifying, and placing incipient caries lesions in perspective. Dental Clinics, 49(4), 701-723.
38. Senneby, A., Davies, J. R., Svensäter, G., & Neilands, J. (2017). Acid tolerance properties of dental biofilms in vivo. BMC microbiology, 17(1), 165.
39. Love, R. M., & Tanner, A. C. (2017). Microbiology of Dental Caries and Dentinal Tubule Infection. Endodontic Microbiology, 25-49.

40. Jiménez-Farfán, M. D., Sánchez-García, S., Ledesma-Montes, C., Molina-Frechero, N., & Hernández-Guerrero, J. C. (2001). Fluorosis dental en niños radicados en el suroeste de la Ciudad de México. *Rev Mex Ped*, 68(2), 52-55.
41. Urzúa, I., Stanke, F., & Mariné, A. (1999). Nuevas estrategias en cariología. Factores de Riesgo y Tratamiento. 3ª ed. Stgo de Chile: Arancibia
42. Balderas Delgadillo, C. (2013). Efecto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento y formación de biopelícula de microorganismos productores de caries.
43. Pai, M. R., Acharya, L. D., & Udupa, N. (2004). Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel—a 6-week clinical study. *Journal of ethnopharmacology*, 90(1), 99-103.
44. Fernandes Filho, E. S., Morais, S. M. D., Fonseca, S. G. D. C., & Mota, O. M. D. L. (1998). Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham (Alecrim pimenta). *Rev. ABO nac*, 323-5.
45. Fine, D. H., Furgang, D., Barnett, M. L., Drew, C., Steinberg, L., Charles, C. H., & Vincent, J. W. (2000). Effect of an essential oilcontaining antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(3), 157-161.
46. Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., & Duarte, A. P. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79, 274-282.
47. Chaudhari, LKD, Jawale, BA, Sharma, S., Kumar, HSM y Kulkarni, PA (2012). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales disponibles comercialmente contra *Streptococcus mutans*. *The Journal of Contemporary Dental Practice* , 13 (1), 71-74.
48. Goldbeck, J. C., do Nascimento, J. E., Jacob, R. G., Fiorentini, Â. M., & da Silva, W. P. (2014). Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis*

against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Industrial Crops and Products*, 60, 304-309.

49. Granados, G., Santafé, G., & Acevedo H. (2015). Composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Eucalyptus camaldulensis* de norte de Santander (Colombia). *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*, 18, 235-240.

50. Duke, J. A., & Wain, K. K. (1981). *Medicinal plants of the world. Computer index with more than, 85(000)*, 3.

51. Ali, N., Ahmed, G., Ali shah, S., Shah, I., Ghias, M., & Khan, I. (2011). Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citri nus* Curtis. *BMC Complement Altern Med*, 11, 90-99

52. Rueda, X. Y., & Mogollón, O. F. C. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 52-61.

53. LUÍS, Ângelo, et al. Tocones de *Eucalyptus globulus* como fuente de polifenoles antioxidantes y antimicrobianos. *Moléculas*, 2014, vol. 19, no 10, pág. 16428-16446.

54. Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.

53. Eva, G. C. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista offarm* 23 (6), 80-84.

54. Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 438-469.

55. Quinchuela Barahona, C. D., & Vaca Estrella, I. A. (2020). Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya* (Orchidaceae) del Ecuador (Bachelor's thesis).

56. Mariani, M. J., Jaimes, G., & Fernandez, D. (2010). Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* in vitro. *ODOUS científica*, 11(1), 15-22.
57. Jamil, K. (2017). Estimation of the antibacterial activity of plant extracts of *Phyllanthus emblica*, *Terminalia Chebula* and *Eucalyptus globulus* against oral pathogens. *Int J Dent Oral Heal*, 3, 9-100.
58. Gruszycki, M. R., Valenzuela, G. M., Báez, M., Leguiza, P. D., Gruszycki, A. E., & Alba, D. A. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(2), 425.
59. Bulugahapitiya, V. P. (2013). *Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods* (1ra. ed.). Matara, Sri Lanka: Indika Graphics.
59. Goldbeck, J. C., do Nascimento, J. E., Jacob, R. G., Fiorentini, Â. M., & da Silva, W. P. (2014). Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Industrial Crops and Products*,
60. Tovalino, F. R. M., & Contreras, S. S. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Revista Estomatológica Herediana*, 20(1), 19-24.
61. Xiang, Z., Li, Z., Ren, Z., Zeng, J., Peng, X., Li, Y. y Li, J. (2019). EzrA, un regulador de la forma celular que contribuye a la formación de biopelículas y la competitividad en *Streptococcus mutans*. *Microbiología oral molecular* , 34 (5), 194-208.
62. Mohammed NA In vitro, antimicrobial activity of *Eucalyptus spathulata* leaf extracts against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Magazine of the Al Rafidain University College*. 2014; 33: 1–6.

63. Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., & Duarte, A. P. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79, 274-282.
64. Banavar Ravi, S., Nirupad, S., Chippagiri, P. and Pandurangappa, R. (2017). Antibacterial effects of natural herbal extracts on *Streptococcus mutans*: Can additives be possible in toothpastes ?. *International Journal of Dentistry*, 2017, 4921614. <https://doi.org/10.1155/2017/4921614>
65. Yamakoshi, Y., Murata, M., Shimizu, A. and Homma, S. (1992). Isolation and characterization of macrocarpal antibacterial compounds BG from *Eucalyptus macrocarpa*. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 56 (10), 1570-1576.
66. Paschoal, M. A., Tonon, C. C., Spolidório, D. M., Bagnato, V. S., Giusti, J. S., & Santos-Pinto, L. (2013). Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*,
67. Li X, Yin L, Ramage G, et al. Assessing the impact of curcumin on dual-species biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Microbiologyopen*. 2019; 8 (12): e937. doi: 10.1002 / mbo3.93764.
- 68.68.

Anexos

Anexo 1

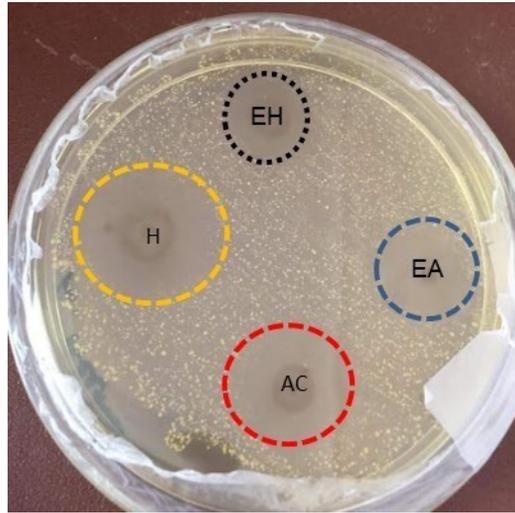


Figura A1: Halo de inhibición de cada una de las fracciones sobre las colonias bacterianas de *Streptococcus mutans*

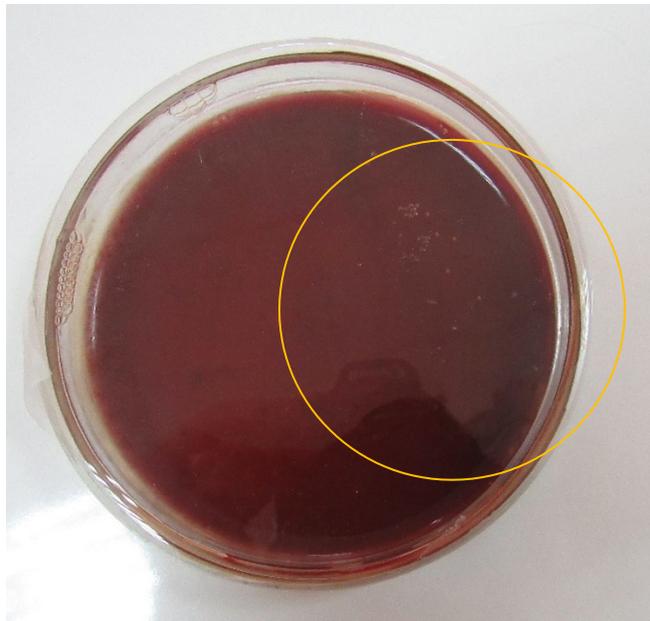
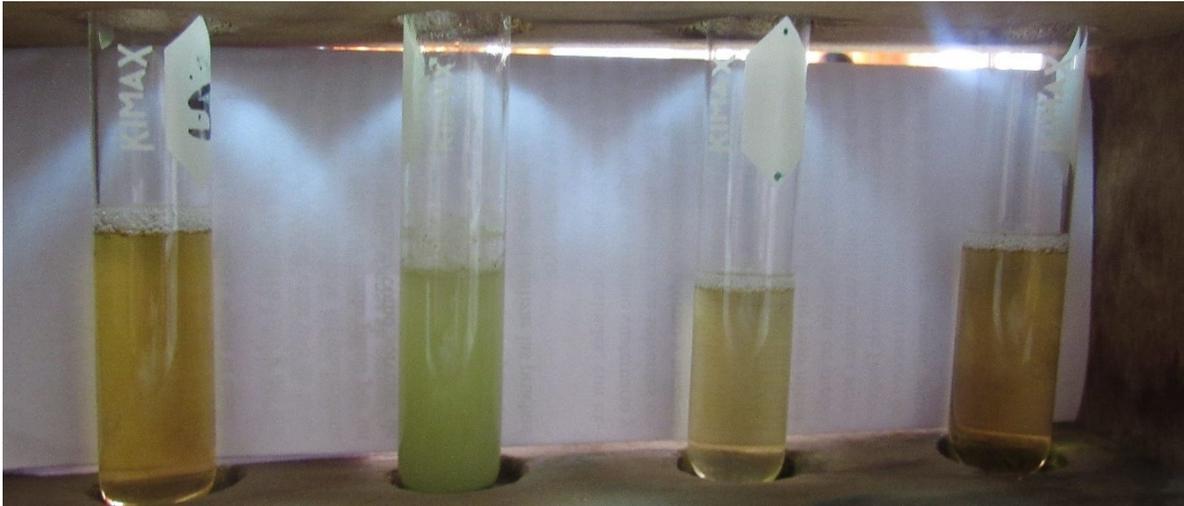


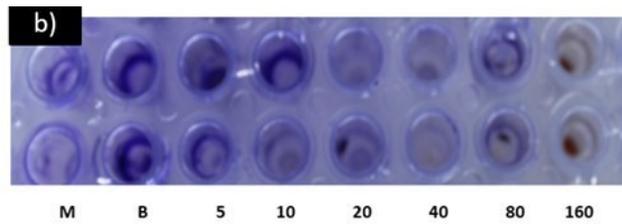
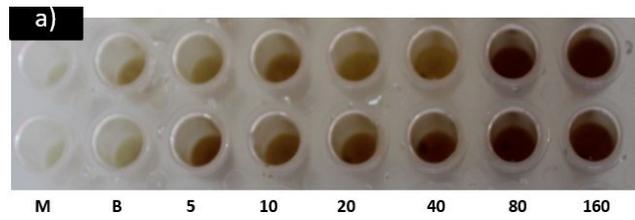
Figura A2: Colonias bacterianas de *Streptococcus mutans* en medio de cultivo BHI inoculadas a 37°C por 24 horas



Anexo 3: Prueba de espuma por 30 min después de agitación para la observación de saponinas



Anexo 2: Prueba de Cloruro férrico para la observación de fenoles



Anexo 4: a) Observación cualitativa en la formación de biopelícula con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico y *Streptococcus mutans*.

b) Observación después de haberse inoculado y lavados con cristal violeta