



## ARTÍCULO ORIGINAL

Online ISSN: 2665-0193 - Print ISSN: 1315-2823

**Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Acmella repens* sobre *Streptococcus mutans*, estudio in vitro****Antibacterial effect of aqueous extract of *Acmella repens* on *Streptococcus mutans*, in vitro study**

Mejía Caguasango Amparo<sup>1</sup>, Sotelo Garzón Esteban<sup>2</sup>, Montaña Tatés Victor<sup>2</sup>, Soler Carvajal Fabio<sup>3</sup>, Tenorio Peñafiel Pablo<sup>1</sup>, Armas Vega Ana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Odontóloga, Universidad Central del Ecuador. <sup>2</sup>Odontólogo, Universidad UTE. <sup>3</sup>Microbiólogo y Bioanalista, Universidad Industrial Santander. <sup>4</sup>PhD en Operatoria dental, Docente Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. esteban2095@hotmail.es

Recibido: 16/11/2018  
Aceptado: 20/03/2019

**Resumen**

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de Botoncillo (*Acmella repens*) en concentraciones del 15%, 25% y 50% v/v sobre *Streptococcus mutans*. Se usaron 15 cajas petri con agar sangre de cordero, se inoculó *S. mutans* y se colocaron discos filtro con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Acmella repens* al 15%, 25% y 50%, como sustancias de control Clorhexidina al 0,12% y suero fisiológico, tras 5 días de incubación se midieron empleando una regla milimétrica, los halos de inhibición, formados alrededor de los respectivos discos. Como resultado se obtuvo que el extracto de Botoncillo al 50% mostró diferencias significativas en comparación con las concentraciones al 15% y 25% ( $p < 0,001$ ), sin embargo, al comparar el extracto de Botoncillo al 50% con la Clorhexidina al 0,12%, se observaron valores de inhibición más altos para la Clorhexidina al 0,12%. Se concluye que el extracto acuoso de Botoncillo presentó un efecto antibacteriano sobre *S. mutans*.

**Palabras clave:** Antibacterianos, caries dental, *Streptococcus mutans*, técnicas in vitro.

**Summary**

The aim of this study was to determine the antibacterial effect of the aqueous extract of Botoncillo (*Acmella repens*) in concentrations of 15%, 25% and 50% v/v on *Streptococcus mutans*. 15 petri dishes with lamb blood agar were used, *S. mutans* were inoculated and filter discs with different concentrations of 15%, 25% and 50% *Acmella repens* aqueous extract were placed as control substances 0.12% Chlorhexidine and physiological serum, after 5 days of incubation were measured using a millimeter ruler, the inhibition halos, formed around the respective discs. As a result, it was obtained that the 50% Button extract showed significant differences compared to the 15% and 25% concentrations ( $p < 0.001$ ), however, when comparing the 50% Button extract with the 0, Chlorhexidine, 12%, higher inhibition values were observed for 0.12% Chlorhexidine. It is concluded that the aqueous extract of Botoncillo had an antibacterial effect on *S. mutans*.

**Keywords:** Anti-bacterial agents, dental caries, *Streptococcus mutans*, in vitro techniques.

## Introducción

Las plantas medicinales actualmente son un método muy utilizado en zonas de Latinoamérica para el tratamiento sintomatológico, principalmente el dolor, de algunas patologías.<sup>1</sup>

La caries es considerada como una enfermedad crónica, infecciosa, multifactorial de origen microbiano, localizado en los tejidos duros del diente<sup>2</sup>, que empieza como una desmineralización del esmalte resultante de la acción ácidos orgánicos producidas por bacterias orales específicas que metabolizan a los carbohidratos de la dieta<sup>3</sup>; al ser una enfermedad multifactorial, interactúan factores dependientes del hospedero, la dieta, la biopelícula dental y el tiempo, produciéndose un desequilibrio de estos.<sup>4</sup>

*Streptococcus mutans* es el microorganismo predominantemente encontrado en el biopelícula relacionado a la producción de caries dental<sup>5</sup>, la biopelícula dental que consta de la presencia de diversas formas bacterianas<sup>6</sup>, formando así una estructura bien organizada de bacterias, virus y hongos<sup>7</sup>.

Considerado como un grupo formado por diversos cocos Gram positivos que normalmente se disponen en parejas o cadenas, *Streptococcus spp* forma el grupo de anaerobios facultativos capnófilos, sus exigencias nutricionales son complejas y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero, son capaces de fermentar carbohidratos, proceso que produce ácido láctico y otros ácidos con variable potencial cariogénico siendo además, catalasa negativos<sup>8</sup>.

Los enjuagues bucales constituyen mecanismos frecuentemente empleados en el control de la enfermedad caries dental, por ser sistemas de

administración seguros, eficaz como agente antimicrobiano y anti-biopelícula, capaz de inhibir la adhesión bacteriana, la colonización y la actividad metabólica que en última instancia afecta el crecimiento bacteriano<sup>9</sup>; la mayoría de estos productos químicos provienen de estudios fitoquímicos de plantas medicinales.

El objetivo del presente estudio *in vitro* fue determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Acmella repens* (Botoncillo) en concentraciones del 15%, 25% y 50% sobre *S. mutan*.

## Material y métodos

Se plantea un estudio *in vitro* con 100 gramos de hojas y flores de botoncillo (*Acmella repens*), tras un riguroso análisis visual y de acuerdo a los criterios de inclusión (ejemplares frescos, limpios, libres de contaminación), y de exclusión (ejemplares incompletos y marchitos) se eligió los especímenes en buen estado y libres de impurezas. Mediante percolación química se obtuvo concentraciones al 15 %, 25% y 50%, realizado con solvente polar en el laboratorio químico de la Universidad Central del Ecuador, y fueron almacenados en frascos color ámbar por un periodo de un día, en un ambiente seco y libre de luz.

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó una cepa liofilizada de *S. mutan* (ATCC 25175, Ecuador), activada en 1ml de caldo nutritivo TSB (tryptic soy broth, Novachem, Ecuador); con el fin de fomentar el crecimiento del microorganismo liofilizado, el mismo fue sembrado por diseminación en cajas petri de agar sangre de cordero 5% (Cultiprep, Ecuador).

El método de siembra fue por diseminación con asa estéril, y se verificó que las colonias no estuvieran contaminadas con tinción gram. Las mismas fueron observadas en microscopio a

campo de 100x y se evidencio cocos gram positivos en cadenas, característico de *S. mutan*. Los discos de papel filtro (Whatman<sup>TM</sup>, España) fueron impregnados con 20 µl de cada una de las concentraciones a 15 %, 25% y 50% de los extractos de botoncillo.

Como control positivo para sensibilidad se utilizó clorhexidina al 0,12% (Lacer, España) y como control negativo suero fisiológico. Se procedió a colocar los discos con pinzas estériles y presionar sobre el agar; las mismas fueron rotuladas con la concentración del extracto usado e incubadas a 37° C en una jarra de anaerobiosis hermética Gas Pak Plus<sup>TM</sup>.

La evaluación de la actividad inhibitoria se realizó tras 120 horas de incubación, con reglas milimétricas valorando el diámetro de los halos formados alrededor de los discos filtro.

Se considero que mientras mayor haya sido el diámetro del halo, la sustancia presentaba mayor efectividad sobre la inhibición en el crecimiento de cepas de *S. mutan*. Los valores fueron recolectados en tablas Excel con la ayuda del software SPSS23 y pruebas estadísticas la prueba de Kruskal-Wallis y con la prueba de Shapiro-Wilk.

## Resultados

Los datos analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y con la prueba de Shapiro-Wilk demostraron que dos de los grupos (suero fisiológico y extracto al 15%) fueron excluidos del análisis, debido a que no existió acción inhibitoria con estas dos concentraciones empleadas.

Al evaluar el extracto al 25 % se evidencio una leve capacidad inhibitoria con un halo medio de 6,4mm. De igual manera se observó que el extracto al 50% presento una mayor actividad inhibitoria con un halo medio de 10,7 mm.

El control positivo evidencio una capacidad de inhibición mayor a los grupos de prueba con un halo medio de 12,4 mm.

La prueba de Kruskal-Wallis reveló un valor de significancia de  $p < 0,001$ , permitiendo inferir que si existieron diferencias respecto a la tendencia central de las poblaciones, por lo cual se realizó la prueba dos a dos, con lo que se determinó que son diferentes entre las sustancias con significación menor a 0,05: como es el caso del halo formado por el grupo al 25% con extracto de Botoncillo (*Acmella repens*) y el del 50%, así como con el de la Clorhexidina, en tanto que el extracto de Botoncillo al 50% no presentó diferencia significativa al ser comparado con Clorhexidina al 0,12%.

**Tabla 1.** Halo Inhibitorio (mm) por concentración

Sustancia Empleada	Halo Inhibitorio	Concentración
Extracto de Botoncillo	< 3mm	15%
Extracto de Botoncillo	6,4 mm	25%
Extracto de Botoncillo	10,7mm	50%
Suero fisiológico	< 3mm	
CHX	12,4mm	0.12%

**Fuente:** Caguasango et al.

## Discusión

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias químicas que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos<sup>10</sup>; si bien diferentes estudios emplean productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica<sup>11</sup>, actualmente se ha limitado el uso de productos vegetales a la administración por vía oral o tópica<sup>12</sup>, pero mediante investigación científica se ha

demostrado que se han usado plantas medicinales para sanar diferentes enfermedades<sup>13</sup>, mostrando una amplia gama de principios activos en estas plantas, asociados a la presencia de alcaloides, glucósidos o heterósidos, mucílagos, gomas y taninos<sup>14</sup>, que serían de gran ayuda en un tratamiento de patologías, fue el empleo por comunidades andinas de la sierra central ecuatoriana del Botoncillo (*Acmella repens*) lo que nos incentivó la ejecución de este estudio.

La planta es encontrada frecuentemente en países tropicales y subtropicales; principalmente la India y América del Sur popularmente se conoce como planta de “dolor de muelas” ya que reduce la severidad de una odontalgia<sup>15</sup>. Es considerada planta suberecta llegando a medir hasta 50 cm de altura, presenta tallos pequeños con entrenudos entre 1 a 4 cm de largo de color verde, hojas con pecíolos subsésiles de ovaladas a óvalo-lanceoladas, flores amarillas que se asemejan a un botón; sus hojas, flores y ramas son picantes al masticar, adormecen las mucosas de la boca y labios produciendo un efecto anestésico<sup>16</sup>, debido al alcohol aromático spilantol, la spilantina y otras sustancias similares; dentro de los usos etno-medicinales de Botoncillo, las hojas y las flores son empleadas para endurecer, limpiar y blanquear los dientes, e incluso manteniendo las encías saludables, ya que al masticar las hojas se previene la caries dental y enfermedades periodontales debido a su mecanismo antibacteriano<sup>17</sup>. La acción antibacteriana del Botoncillo a nivel de patógenos comunes, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, fue evidenciada en otros estudios.<sup>18</sup>

El extracto acuoso de Botoncillo (*Acmella repens*) al 50%, presentó un efecto inhibitorio cercano a los niveles alcanzados por la Clorhexidina al 0, 12 %, observándose que a concentraciones menores existió menor poder inhibitorio.

La Fitoterapia busca a través del empleo de diferentes plantas medicinales, encontrar alternativas para enfermedades que frecuentemente afectan al ser humano; este es el caso específico de nuestro estudio donde se empleó el Botoncillo (*Acmella repens*), lo que llevo a evaluar su poder inhibitorio frente a *Streptococcus mutan*, siendo considerado como el principal causante de caries dental en mamíferos.

Estudios previos refieren la existencia de diferencias significativas entre el extracto etanólico de Botoncillo al 100% y Clorhexidina al 0, 12% sobre la cepa de *Porphyromona gingivalis*; existen estudios realizados en la India donde emplearon como medicación intraconducto concentraciones de 2%, 5% y 10% de Botoncillo con éter de petróleo como solvente, mostrando una significativa actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis*.<sup>19</sup>

Este estudio constituye un aporte científico en la búsqueda de principios fitoactivos en Ecuador, que representen nuevas alternativas frente a microorganismos desencadenantes de enfermedades a nivel bucal y rescatar el conocimiento fármaco-ancestral sobre el uso del Botoncillo; si bien no fue posible encontrar literatura suficiente respecto a este espécimen natural, logramos demostrar que es una planta que posee una acción beneficiosa para la salud, que nuestros antepasados conocían pero aún faltan estudios científicos más rigurosos que demuestren su capacidad antimicrobiana.

## Conclusión

En las condiciones que este estudio *in vitro* fue ejecutado, podemos concluir que el extracto acuoso de *Acmella repens* (Botoncillo) tiene una apropiada efectividad antimicrobiana a una concentración del 50% v/v sobre *S. mutan* comparable con el efecto inhibitorio observado en la CHX.

## Referencias

1. Benítez N. Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género Piper L(Piperaceae). Rev Inst Univ Tec Chocó. 2008; 27(1): 67-75.
2. Melgar RA, Tatith PJ, Blaya LP, Neves HF, Borba F. Differential Impacts of Caries Classification in Children and Adults: A Comparison of ICDAS and DMF-T. Braz Dent J. 2016; 27(6): 761-66.
3. Sung YH, Son HH, Yi K, Chang J. Elemental analysis of caries-affected root dentin and artificially demineralized dentin. Restor Dent Endod. 2016; 41(4): 255-61.
4. Cevallos JF, Aguirre AA. Método pronóstico de valoración de riesgo para caries dental por consumo de chocolate. Rev. Odontológica Mexicana. 2015; 19(1): 27-32.
5. Peedikayil FC, Remy JS, Chandru TP, Sreenivasan P, Bijapur GA. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: An in vivo study. J Int Soc Prev Community Dent. 2016; 6(5): 447-52.
6. Filoche S, Wong L, and Sissons CH. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. J Dent Res. 2010; 81(1): 8-18.
7. Oilo M, Bakken V. Biofilm and Dental Biomaterials. MDPI. 2015; 8(6): 2887-900.
8. Ojeda Garcés JC, Oviedo E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev CES Odont. 2013; 26(1): 44-56.
9. Hegde RJ, Kamath S. Comparison of the *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* colony count changes in saliva following chlorhexidine (0.12%) mouth rinse, combination mouth rinse, and green tea extract (0.5%) mouth rinse in children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2017; 35(2): 150-5.
10. Moscatelli VA. Química y farmacología de una planta medicinal argentina: Artemisia copa. Dominguezia. 2015; 31(1): 5-13.
11. Cañigueral S, Dellacassa E, Bandoni AL. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo Lat Am J Pharm. 2003; 22(3): 265-78.
12. Torres V, Castro AE. Fitoterapia. Rev. Act. Clin. Med. 2014; 20: 2185-9.
13. Rodríguez LM. Etnobotánica maya: Algunas plantas de uso medicinal en estomatología. Revista ADM. 2014; 72(1): 21-5.
14. Loraine S, Mendoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Rev. Mex Ciencias Farmacéuticas. 2010; 94(4): 18-27.
15. Omonike, OT, Toluwanimi EA, Peter AS, Temitope CF and Adekunle JA. In vitro antiviral activity of twenty-seven medicinal plant extracts from Southwest Nigeria against three serotypes of echoviruses. Virol J. 2018; 15(1): 110-8.
16. Suchita D, Siddhartha M, Mahendra S, Shubhini AS, Sudipta S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. Hindawi Pub Corp. 2013; 2013: 1-9.
17. Valdivia I, Párraga A. Estudio etnobotánico y fitoquímico de la *Acmella spilanthis* (Botoncillo), y su importancia en la medicina. Praxis. 2012; 7(1): 60-71.
18. Padhan D, Pattnaik S, Behera AK. Growth-arresting Activity of *Acmella* Essential Oil and its Isolated Component D-Limonene (1, 8 P-Mentha Diene) against *Trichophyton rubrum*. Pharmacogn Mag. 2017; 13(3): 555-60.
19. Savitha S, Bijoch J, Sharath Chandra H. Antimicrobial and antifungal efficacy of *Spilanthes acmella* as an intracanal medicament in comparison to calcium hydroxide: An in vitro study. Int J Dent Research. 2016; 26(5): 528-32.