

Extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*: alternativa para prevenir formación de placa bacteriana mediante control del *Streptococcus mutans*

Hydroalcoholic Extract of *Eucalyptus globulus*: an Alternative to Prevent Bacterial Plaque Formation by Control of *Streptococcus mutans*

María del Pilar Acosta^{1*} <https://orcid.org/0009-0001-3318-1747>

Andrés Ignacio Rodríguez² <https://orcid.org/0000-0003-0101-8328>

Sergio Fermín Benavides³ <https://orcid.org/0000-0002-4099-2310>

¹Universidad Adventista de Chile, Facultad de Ciencias de la Salud. Chillán, Chile.

²Universidad del Bio, Facultad de Ciencias. Bio, Chillán, Chile.

³Universidad San Sebastián, Facultad de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias del Cuidado de la Salud, Nutrición y Dietética. Concepción, Chile.

*Autor para la correspondencia pilaracosta@unach.cl

RESUMEN

Introducción: Una *biopelícula* es un conjunto de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de polisacáridos y permite su adherencia a una superficie inerte o tejido vivo. Un patógeno formador de esta estructura es el *Streptococcus mutans* microorganismo acidófilo formador de glucanos por activación de la enzima glucosiltransferasa, de la biopelícula bucal y agente etiológico de la caries dental al incrementar cambios en la superficie dentaria, además de colaborar en el desarrollo de diferentes enfermedades bucales, en las que productos naturales provenientes de las plantas son alternativa eficiente para su prevención y tratamiento.

Objetivo: Evaluar la acción antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Eucalyptus globulus* sobre la bacteria *Streptococcus mutans* y su efecto sobre la

formación de una biopelícula, centrada en su efecto anti *quórum sensing* y producción de exopolisacáridos.

Método: La actividad antimicrobiana fue determinada por concentración mínima inhibitoria de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* (5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL) contra *Streptococcus mutans*, la alteración, formación de biopelícula y actividad de glucosiltransferasa mediante producción de glucano no soluble. El nivel de significancia estadística fue $p < 0,05$.

Resultados. Se determinaron varios productos naturales (fenoles, flavonoides, taninos, saponinas y cumarinas) que disminuían la proliferación celular. La concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* fue de 20 µg/mL ($\pm 0,138$ DO) se observó relación inhibitoria entre sus concentraciones de 40, 80 y 160 µg/mL, formación de biopelícula y producción de glucano.

Conclusiones. Los productos naturales presentes en el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* inhiben la formación de la biopelícula y producción de glucano, factores cariogénicos del *Streptococcus mutans* y los convierte en herramientas aplicativas para su control, así como en alternativas para la elaboración de productos de uso bucal (cremas, enjuagues dentales, etc.) de menor costo y gran acción terapéutica.

Palabras clave. *Streptococcus mutans*; *Eucalyptus globulus*; biopelícula microbiana.

ABSTRACT

Introduction: A biofilm is a set of microorganisms that grow embedded in a polysaccharide matrix and allows their adherence to an inert surface or living tissue. A pathogen that forms this structure is *Streptococcus mutans*, an acidophilic microorganism that forms glucans by activation of the enzyme glucosyltransferase, of the oral biofilm and etiological agent of dental cavities by increasing changes in the dental surface, besides collaborating in the development of different oral diseases, in which natural products from plants are an efficient alternative for their prevention and treatment.

Objective: To evaluate the antimicrobial action of hydroalcoholic extracts of *Eucalyptus globulus* leaves on *Streptococcus mutans* bacteria and their effect on biofilm formation, focusing on their anti quorum sensing effect and production of exopolysaccharides.

Methods: The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration of different concentrations of the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* (5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL) against *Streptococcus mutans*, the alteration, biofilm formation and glycosyltransferase activity by production of non-soluble glucan. The level of statistical significance was $p < 0.05$.

Results. Several natural products (phenols, flavonoids, tannins, saponins and coumarins) that decreased cell proliferation were determined. The minimum inhibitory concentration of the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* was 20 µg/mL (± 0.138 OD) inhibitory relationship was observed between its concentrations of 40, 80 and 160 µg/mL, biofilm formation and glucan production.

Conclusions: The natural products present in the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* inhibit the formation of biofilm and glucan production, cariogenic factors of *Streptococcus mutans* and make them applicable tools for its control, as well as alternatives for the elaboration of products for oral use (creams, dental rinses, etc.) of lower cost and great therapeutic action.

Keywords. *Streptococcus mutans*; *Eucalyptus globulus*; microbial biofilm.

Recibido:13/10/2023

Aprobado: 22/02/2024

Introducción

Una placa *biopelícula* microbiana (BM) se define como un conjunto de microorganismos de distintas especies, que se agrupan formando una comunidad o consorcio mediante la producción de sustancias biopoliméricas que facilitan su agregación⁽¹⁾ y se caracteriza por presentar una alta densidad celular y estar conformada por una importante cantidad de especies, generando en sí misma un microecosistema heterogéneo que asegura su supervivencia,⁽²⁾ propiedad debida a la facilidad del intercambio y expresión genética que, en algunos casos otorga una alta tasa de resistencia a agentes antimicrobianos como los antibióticos.⁽³⁾

La conformación de una BM se fundamenta por las interacciones beneficiosas entre especies y la generación de exopolisacáridos bacterianos, que no solo incrementan la resistencia al sistema inmune, sino que cimentan su adherencia y estructuración y puede resultar en un serio problema de salud humana en lo referido a salud bucal, al facilitar la formación de caries y generar otras enfermedades parodontales con gran resistencia antimicrobiana.⁽⁴⁾

La BM bucal posee varios tipos de microorganismos entre los que destaca como especie dominante el *Streptococcus mutans*, bacteria cocácea gram positiva agrupada en cadenas, inmóvil, catalasa positiva, productora de ácido láctico a partir de azúcares simples y capaz de cambiar el pH del medio desde 7,0 a 4,2 en aproximadamente 24 h⁽⁵⁾ dada la alta tasa de conversión azúcar/ácido láctico que posee.

Esta capacidad se debe a que cuenta con algunas enzimas que hidrolizan la sacarosa y otros azúcares simples en monosacáridos y transfieren la fracción fructosa a la formación de un exopolisacárido conocido como fructano, a la vez que la glucosa proporciona en su mayor parte energía a la bacteria, pero en cantidad menor al ser metabolizada para la generación de un segundo exopolisacárido, el glucano.⁽⁶⁾

Una serie de experimentos *in vitro* demuestran que particularmente los glucanos permiten al *Streptococcus mutans* adherirse a las superficies⁽⁵⁾ al generar su fijación y asegurar la supervivencia de la posterior colonia generada.

Lo anterior sugiere que a nivel *in vivo*, estos exopolisacáridos permiten que la bacteria pueda generar sujeción a la superficie dental al acumularse de manera progresiva, entorpeciendo el proceso de mineralización, debilita la estructura dentaria y deriva en la formación de una lesión superficial que vulnera la integridad del diente, formando una caries que permite a la bacteria infectar sus tejidos blandos e incluso le permite llegar a tener acceso al tejido cerebral⁽⁷⁾ motivo consecuente para que se busquen alternativas que permitan limitar la presencia de bacterias como el *Streptococcus mutans*, o que ayuden a evitar o disminuir su capacidad de producción de exopolisacáridos, evitando así la sujeción y formación de una BM compleja.

En la actualidad, la mayoría de los productos utilizados para el control de la placa bacteriana dental (tipo de BM) tienen función efectiva, pero poco específica, es decir, son productos con capacidad antimicrobiana general, como los antibióticos de uso bucal

(amoxicilina, azitromicina, clindamicina, entre otros) y los agentes antisépticos como la clorhexidina. No obstante, estos productos en su mayoría han incrementado la resistencia del *Streptococcus mutans* y de otras especies bacterianas y ha llevado a la comunidad científica a la búsqueda de nuevos compuestos naturales con buen equilibrio costo-efectivo y menor toxicidad.⁽⁸⁾

Algunos estudios^(8,9,10) han señalado la eficacia de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos de origen vegetal en el control del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* y otras bacterias bucales, como los aceites esenciales con capacidad antimicrobiana presentes en el tomillo, el orégano, el romero, el ajo, la manzanilla, la menta e incluso algunos muy utilizados popularmente, como los compuestos aromáticos del eucalipto (*Eucalipto radiata*), lo que demuestra que si bien es cierto que existen extractos naturales con propiedades antimicrobianas de uso bucal, su efectividad ha sido evaluada en términos de capacidad antimicrobiana o de capacidad para inhibir o eliminar microorganismos, pero no sobre su capacidad para evitar la formación de la BM y con ello evitar la formación de un andamiaje microbiano multiespecies.⁽¹⁰⁾

Pese a saberse que la formación de una BM, requiere de la detección de un *quórum sensing*, es decir de la detección de una respuesta asociada a la regulación de la expresión génica microbiana,⁽¹¹⁾ respuesta dada en función tanto de la densidad poblacional microbiana, como de sus fluctuaciones y tasas de proliferación.

Cuando los microorganismos incrementan su densidad celular o aumentan sus tasas de proliferación se llega a un "umbral" cuya detección produce una señal bioquímica en las bacterias que las induce a la producción de moléculas autoinductoras,⁽¹²⁾ las que al ser captadas provocan la inducción de un incremento en la expresión génica y significativa ventaja para la supervivencia microbiana, pues la expresión génica gatilla un incremento en la capacidad simbiótica entre especies diferentes, incremento de su virulencia o formación de exopolisacáridos que facilitan la formación de una BM, entre otras propiedades.⁽¹³⁾

En el caso específico del *Eucalyptus radiata*, como especie antimicrobiana, se sabe que su aceite esencial tiene la capacidad de poseer actividad anti *quórum sensing*, o que puede inhibir la capacidad de algunas bacterias para detectar una alta densidad

poblacional o una alta tasa de proliferación y en consecuencia puede afectar o reducir la expresión génica limitando, entre otros fenómenos, la formación de exopolisacáridos para la formación de una BM⁽¹¹⁾ y motivó en esta investigación evaluar la acción antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Eucalyptus globulus* sobre la bacteria *Streptococcus mutans* y su efecto sobre la formación de una BM, centrada en el efecto anti *quórum sensing* y la producción de exopolisacáridos.

Métodos

Preparación del extracto vegetal

El extracto vegetal se preparó en el laboratorio de Química de la Universidad Adventista de Chile (Chillán, Chile). Las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill. fueron recolectadas entre marzo a junio (otoño) del año 2020 en el sector de Las Mariposas, Chillán, Chile (36°38'12"S 71°59'42"W) en su estación experimental y la caracterización de la especie la realizó Alejandro Marchant en el año 2014. Las hojas obtenidas fueron dispuestas entre láminas de papel secante y mantenidas a 23 ± 1 °C durante 8 días y humedad relativa de ± 40 %.

Las hojas ya secas se trituraron manualmente en un mortero de cerámica. Luego, 200 g de hojas molidas se dispusieron en vasos precipitados de 3000 mL y se le agregaron 1000 mL de agua destilada y 1000 mL etanol al 95 % (Millipore, EMSURE®, Merck). Las maceraciones colocadas en vasos de vidrio color ámbar fueron tapadas con parafilm y dejadas macerar por 48 h en la oscuridad a una temperatura promedio de 20 ± 2 °C.

Finalmente, todos los macerados se filtraron en embudo Buchner y papel filtro 150 mm (Whatman, Grade 512 ½, Merck) utilizando una bomba de vacío a temperatura ambiente (18 ± 1 °C) en una bomba al vacío (Boeco, R-300, *weed lab* Chile).

El filtrado resultante fue dispuesto en frascos ámbar con tapa y guardados en refrigeración (04 ± 1 °C) hasta su uso.

Cultivo de cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC 35668

La cepa *Streptococcus mutans* ATCC 35668 se obtuvo de la empresa Lab-diagnostic (Santiago, Chile). Para su multiplicación se utilizó medio líquido Brain Heart Infusión

(BHI) (FDA-BAM Granu Cult® prime, Millipore, Merck) y se incubó a 37 °C en estufa de cultivo (Pol-Eko, Mod. CL115, Polonia) por 48 h hasta la detección del crecimiento.⁽¹⁴⁾ De las colonias obtenidas se tomaron muestras para microscopía y se ejecutaron pruebas de tinción de Gram.

Determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de concentración mínima bactericida (CMB), se inocularon 20 µL de 1×10^5 unidad formadora de colonias (UFC) de cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en 10 mL de medio Brain Heart Infusion (BHI).⁽¹⁴⁾ Se añadieron diferentes concentraciones de extractos de hojas de *Eucalyptus globulus* 5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/mL; el control positivo fue inoculado solo con medio BHI y bacterias, y como control negativo solo se usó medio de cultivo.⁽¹⁴⁾ Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C con control atmosférico (CO₂). El crecimiento celular se cuantificó por densidad óptica (OD) mediante el uso del espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1900, Japón) a una longitud de onda de 590 nm y el ensayo se realizó por triplicado.

Para determinar la CMI se tomaron 10 µL de muestra de cada tubo de ensayo, la que se adicionó sobre una placa de Petri que poseía medio sólido BHI y fue inoculada por 24 h a 37 °C.

Mediante observación y conteo del número de colonias, la CMI se asignó a la concentración más baja del extracto hidroalcohólico que redujo a 1 logaritmo la concentración celular, mientras que la CMB fue la mínima concentración de extracto que impidió el crecimiento bacteriano en comparación al control.^(15,16)

Paralelamente se determinó el porcentaje inhibitorio relativo de las fracciones, directamente en medio sólido BHI y se inoculó 20 µL de 1×10^5 UFC/mL de cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, el que se adicionó al medio de cultivo con la punta de una micropipeta 1 µL de cada fracción, las cuales se estandarizaron por volumen a una concentración final del 50 % v/v para cada una.

Se usó como control positivo sensidiscos de amoxicilina de 10 µg (Oxoid-Quíos, Santiago, Chile) y control negativo agua, inoculado por 24 h a 37 °C en estufa de cultivo.

El porcentaje de inhibición se calculó restando el halo de inhibición de cada fracción y el halo del control positivo, dividido el halo de inhibición del control positivo menos el control negativo multiplicado por 100.⁽¹⁷⁾

Ensayo de formación de biopelícula en placas de polietileno

Se realizó un cultivo bacteriano inoculando 100 µL de cultivo *Streptococcus mutans* (10⁶ UFC/mL) en placas Petri con agar BHI. Las placas inoculadas fueron cultivadas a 37 °C por 24 h. Luego, se tomaron muestras de las colonias, las cuales se inocularon en 10 mL de caldo BHI, cultivándolo a 37 °C por 24 h. Al final, se realizó una dilución de 1:50 de cultivo original en medio fresco BHI suplementado con 4 % w/v de sacarosa.

Las anteriores soluciones fueron separadas en tubos individuales y les fueron añadidas a las diferentes concentraciones del extracto. Por último, alícuotas de estas soluciones se dispusieron en pocillos de polietileno y se cultivaron a 37 °C por 72 h. Tras este tiempo, se descartó el sobrenadante y se lavó cada pocillo con búfer fosfato. Se agregó 200 µL de etanol al 95 % por una hora. Se secaron a temperatura ambiente por 24 h y se tiñeron con cristal violeta al 1 % w/v para luego ser lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente 20 ± 1 °C y 40 % de humedad. Luego, se añadieron 100µL de solución etanol:acetona a las microplacas y se midió densidad óptica a 630 nm en espectrofotómetro UV-Vis.⁽¹⁷⁾

Producción de glucano

Para evaluar la producción de glucano por parte de *Streptococcus mutans* se inocularon 100 µL de cultivo fresco de *Streptococcus mutans* (10⁶ UFC/mL) en medio BHI suplementado con 4 % w/v de sacarosa y las diferentes concentraciones del extracto. Estos medios fueron cultivados a 37 °C por 24 h.⁽¹⁸⁾

Para la reacción enzimática se agregaron 300 µL de acetato de sodio (Merck millipore, Darmstadt, Alemania), 150 µL de medio crudo, 5 % w/v de sacarosa y 50 µL de fosfato de potasio (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania).

Se incubó nuevamente a 37 °C y 2 % CO₂ por 2 h.

Posteriormente se agregó 1 mL de etanol al 95 % v/v para precipitar los glucanos insolubles y se centrifugó en centrifuga refrigerada para laboratorio, 50 ml × 6, 16000r/min, Modelo CTG-THR16 por 10000 g por 5 min.

Los glucanos precipitados se hidrolizaron con 300 µL de HCl 1M por 30 m, luego se neutralizaron con 300 µL NaOH 1M y para su cuantificación se realizó la prueba de fenol ácido sulfúrico, en espectrofotómetro UV-Vis a absorbancia de 600 nm.⁽¹⁹⁾

Análisis estadístico

Para realizar el análisis de los resultados se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95 % de confianza. Por otro lado, se aplicó el test de comparación de medias de Tukey, Test de comparaciones múltiples de *Dunnett's*, y prueba de Fischer en los casos que hubo diferencias significativas. El nivel de confianza fue del 95 % ($p = 0,05$) para la significancia, mientras que para realizar el análisis se usaron los programas estadísticos Graph Pad Prism 5.00 y Statgraphics Centurion XVIII.

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

Resultados

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

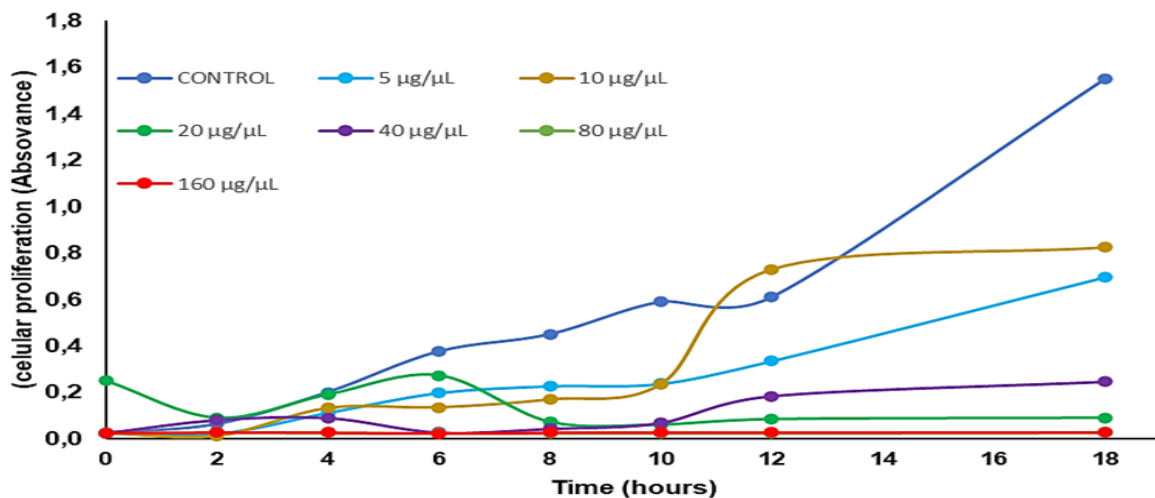
Para determinar la inhibición de *Streptococcus mutans* agente primario de la formación de la placa bacteriana dental, se procedió a realizar una curva dosis-respuesta del crecimiento del microorganismo.

La inhibición de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* con respecto a la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC35668 en un tiempo de 24 h mediante la cuantificación de la densidad óptica fue evidente (fig.1).

Se observó una diferencia significativa del grupo control ($\pm 0,483$ DO) con respecto a las concentraciones mayores a 20 µg/mL ($\pm 0,138$ DO; $p \leq 0,005$); y no se evidenció

diferencias significativas con fracciones menores a 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\pm 0,231, 0,282$ DO, $p \leq 0,005$).

Con respecto a las concentraciones de extracto de 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó una reducción muy significativa en el crecimiento ($\pm 0,0263$ y $0,026$ DO respectivamente). Por tanto, la concentración mínima inhibitoria del extracto se encuentra en 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\pm 0,138$ DO).



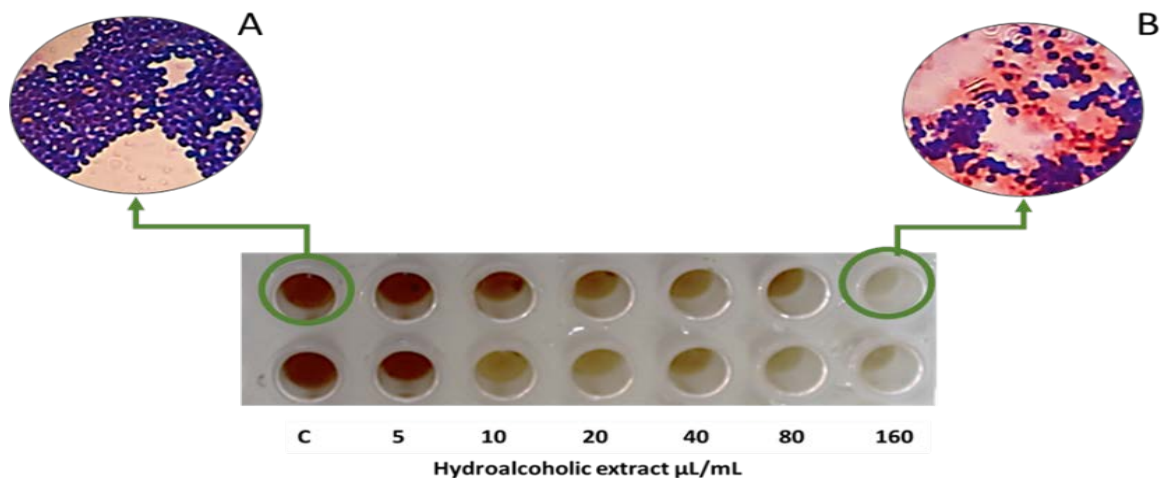
($n = 8$, media + error estándar. * = $p < 0,005$, presenta diferencia significativa a 18 h con respecto al control ANOVA una vía).

Fig. 1 - Inhibición del crecimiento en el tiempo de la cepa de *Streptococcus mutans* por diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*.

Inhibición en la formación de biopelícula *Streptococcus mutans*

Este proceso se acelera a medida que se incrementa la densidad celular, permitiendo la adherencia del microorganismo a una superficie.

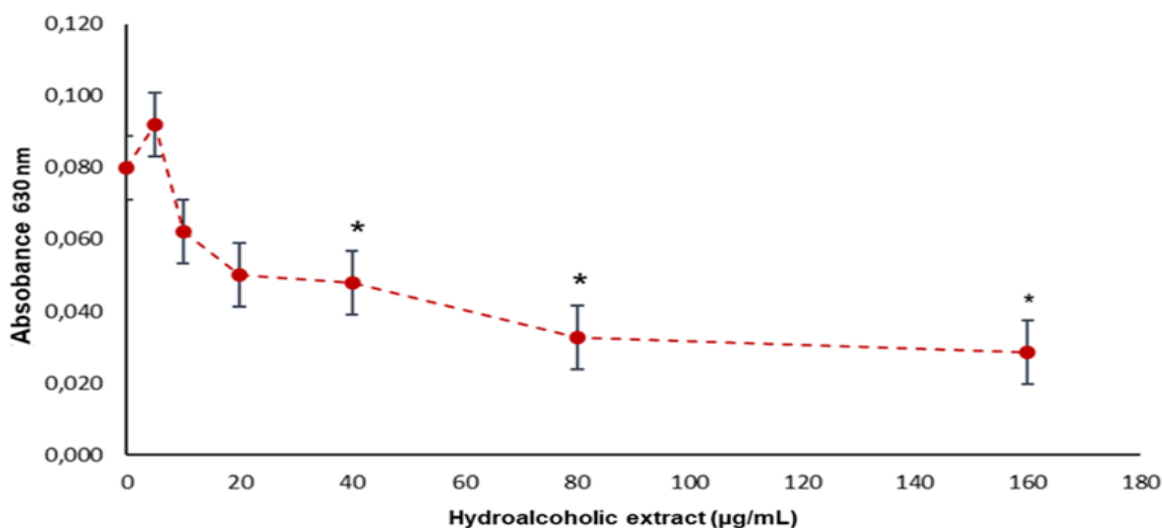
Al evaluar la acción del extracto hidroalcohólico en la formación de la biopelícula de *Streptococcus mutans* sobre una superficie inerte (fig. 2), se mostró reducción al aumentar la concentración de extracto sobre los 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrando una capacidad inhibitoria muy intensa a partir de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\leq 0,2266$; $p = 0,05$).



A) Microscopía óptica verificación de formación biopelícula (Control, sin extracto hidroalcohólico). B) Microscopía óptica ausencia en la formación de biopelícula (160µL/mL de extracto hidroalcohólico en muestras sometidas a tinción de Gram)

Fig. 2 - Formación de BM por parte de *Streptococcus mutans* en placas de polímero

Al comparar las concentraciones mayores del extracto *in vitro* con el uso de colorante cristal violeta, se evidenció que la concentración sobre los 40 µg/mL disminuye cualitativamente la síntesis de la biopelícula por parte de este microorganismo al observarse poca coloración (fig. 3).



(* = $p < 0,005$ con respecto al control) concentraciones que presentan una mayor diferencia significativa con respecto al control. Test de comparación múltiple de Dunnett's, n=9.

Fig. 3 - Promedio de Inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* por diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*

Por otro lado, la densidad óptica (DO) evidenció un valor cercano a cero ($DO \pm 0,01$, $p = 0,005$) en comparación con 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por lo que todavía se puede 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 comprobándose la formación de biopelícula y su adherencia a la superficie inerte, contrario con el control positivo en el cual no se observó crecimiento y tinción. Al cuantificar espectrofotométricamente se observó que no existían diferencias significativas entre estas (valor $DO \pm 0,06$, $0,08$ y $0,00$ respectivamente).

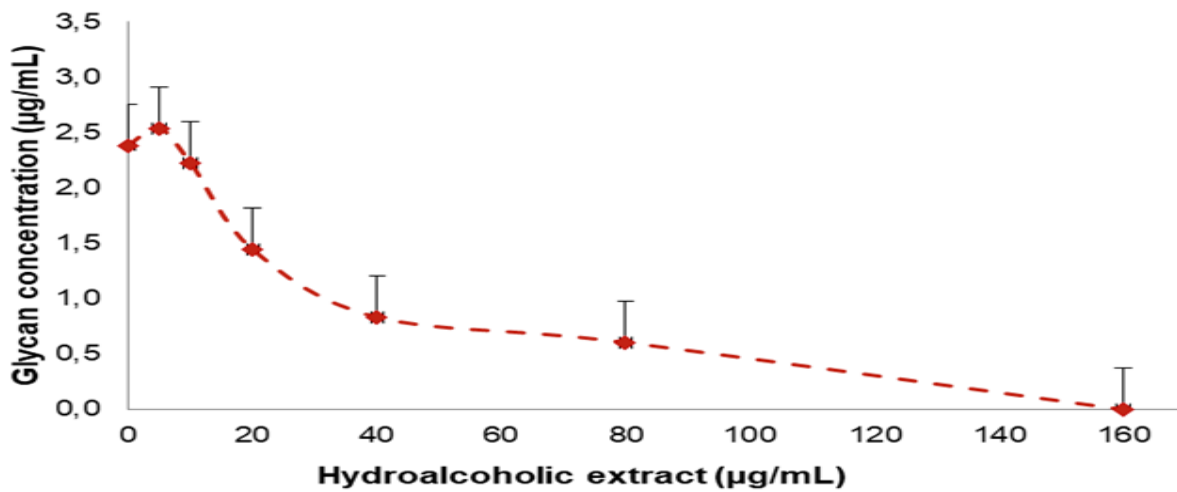
Evaluación de la producción de glucano por *Streptococcus mutans* ante la presencia de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus*

El *Streptococcus mutans* sintetiza el exopolisacárido glucano para sintetizar la estructura sostén de la biopelícula. con el fin de utilizar las enzimas glucosiltransferasas que facilitan la generación de los glucanos.

Con el objetivo de visualizar el efecto de la inhibición enzimática se inocularon crecimientos celulares de *Streptococcus mutans* con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* en la disminución de 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 evidenció diferencias significativas asociadas al efecto de concentraciones de extracto de 40, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al control (1,658; 2,266 y 2,495 respectivamente, $p = 0,005$).

Sin embargo, a concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se evidenció diferencia en la síntesis de glucano por parte de los microorganismos inoculados sin extracto (fig. 4).



(n=6, media + error estándar. **p<0,005, presenta diferencia significativa con el medio sin extracto. ANOVA una vía).

Fig. 4 - Efecto concentración-respuesta del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* sobre producción de glucanos bacterianos (*Streptococcus mutans*).

Discusión

En la actualidad, las acciones más usadas para el control de biopelículas bucales es el uso de antibióticos o compuestos químicos, sin embargo, estos presentan cierta toxicidad y una baja efectividad, debido a que los microorganismos suelen adaptarse a ellos, por lo que el uso de compuestos alternativos y de origen natural, como los aceites esenciales permite disponer de alternativas para su control.

El *Eucalyptus globulus* es un árbol que presenta propiedades medicinales y de sus hojas se puede extraer un aceite esencial con capacidad antimicrobiana, que guarda finalidad con este estudio en el que se pudo comprobar la actividad bactericida de su extracto hidroalcohólico.

Esta actividad fue comprobada experimentalmente por Goldbeck y otros⁽¹²⁾ con aceites esenciales extraídos de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus urograndis* en células plantónicas y de la biopelícula microbiana, en los que tuvo una eficaz y rápida acción (15 y 50 m respectivamente) así como en el control positivo a la inhibición de viabilidad celular mediante el uso de resazurina.

Mientras que otros estudios^(12,17) han evidenciado alta eficiencia en la inhibición del crecimiento del *Streptococcus mutans* en extractos metanólicos de *Eucalyptus globulus*

en comparación con antibióticos (gentamicina) y antimicóticos (nistatina), debido a la presencia de quinonas (jungona y regionola).

Otras investigaciones^(9,11) aseguran que en parte su alta actividad antimicrobiana se debe a la presencia de flavonoides y de glóbulol, un sesquiterpeno presente en el género de esta especie botánica.

Por su parte *Banavar* y otros⁽¹⁸⁾ demostraron que el extracto alcohólico de hojas de esta especie botánica en concentración de 1024 µg/mL inhibe el crecimiento de algunos microorganismos criogénicos, incluido el *Streptococcus mutans*.

Lo que permite deducir que el extracto hidroalcohólico usado en este estudio generó un efecto inhibitorio más intenso sobre este microorganismo (MIC: 160 µg/mL) y hace de este tipo de extracto una alternativa para ser incorporado en algunos productos de uso bucal (cremas, enjuagues y gomas de mascar) a fin de prevenir la formación de la placa bacteriana bucal.

Los resultados en este estudio evidencian que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* controla la actividad enzimática, favorece el proceso de remineralización de la superficie dental y de estabilidad de la hidroxiapatita, evitando la aparición de caries y otras enfermedades parodontales. También al no haber actividad enzimática, la producción de glucano disminuye y con ella, la adherencia de microorganismos patógenos formadores de la placa bucal es menor al reducirse la carga microbiana patógena, tal es el caso del extracto de *Cúrcuma sp.*, al inhibir la liberación de glucosiltransferasa y altera la estructura de la placa.^(16,20)

Lo anterior se ha demostrado mediante ensayos de microscopia electrónica de barrido (SEM) en los que las uniones entre los exopolisacáridos se mostraron cada vez más débiles a medida que aumentó la concentración del extracto vegetal; además de evidenciar que el sistema *quórum sensing* (CS) era afectado negativamente, por la *Cúrcuma sp.*^(16,21)

Este sistema CS participa además en la formación de biopelículas, mediante la liberación de algunos péptidos estimulantes de competencia, que al liberarse y unirse a la histidinaquinasa aumentan la densidad celular permitiendo la respuesta de transcripción de algunas proteínas, proceso que en presencia de cúrcuma y clorhexidina se inhibe al

quedar demostrado que la formación de exopolisacáridos y de la actividad de la glucosiltransferasa disminuye.^(20,21)

Para apoyar la actividad inhibitoria de algunos productos naturales como la Cúrcuma *sp.* y el *Eucalyptus globulus* se ha propuesto el uso de la técnica de análisis morfométrico mediante microscopia electrónica, a fin de poder observar los cambios específicos que se dan en la superficie dental a nivel *in vivo* e *in vitro* y permite suponer que, la presencia de extractos botánicos bioactivos influye sobre los enlaces débiles (covalente y fuerzas de Van der Waals) presentes en la unión de los exopolisacáridos con la membrana celular microbiana impidiendo su unión y adherencia.⁽²¹⁾

Lo que permite poder concluir que los productos naturales presentes en el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* inhiben la formación de la biopelícula y producción de glucano, factores cariogénicos del *Streptococcus mutans* y los convierte en herramientas aplicativas para su control, así como en alternativas para la elaboración de productos de uso bucal (cremas, enjuagues dentales, etc.) de menor costo y gran acción terapéutica.

Referencia bibliográfica

1. Ravishankar Rai V, Bai JA. Trends in Quorum Sensing and Quorum Quenching: New Perspectives and Applications. CRC Press. 2023 [acceso 22/02/24]:628. Disponible en: <https://n9.cl/dce2d>
2. Konopka A. What is microbial community ecology? The ISME journal. 2009;3(11): 1223–30. DOI: [10.1038/ismej.2009.88](https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88)
3. Shirtliff M, Leid JG, editores. El papel de las biopelículas en las infecciones relacionadas con dispositivos. Berlín, Heidelberg: Springer Berlín Heidelberg; 2009.
4. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Formación de biopelículas por el hongo patógeno *Cándida albicans*: desarrollo, arquitectura y resistencia a los medicamentos. J Bacteriol. 2001 [acceso 29/11/23];183(18):5385-94. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11514524/>

5. Ojeda JC, Oviedo E, Salas LA. Streptococcus mutans y caries dental. (Streptococcus mutans and dental caries). CES odontol. 2013 [acceso 22/02/23];26(1):44-56. Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/2684>
6. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for Streptococcus mutans. Infect Immun. 1992 [acceso 29/11/23];60(1):284–95. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1530843/>
7. Guevara PS. Efecto Antibacteriano In Vitro del Extracto Etanólico De Stevia Rebaudiana Sobre Streptococcus Mutans Atcc 25175. Odontología sanmarquina. 2018 [acceso 29/11/23];21(1):2.1 Disponible en: <https://n9.cl/fkeki>
8. Pai MR, Acharya LD, Udupa N. Evaluation of antiplaque activity of Azadirachta indica leaf extract gel—a 6-week clinical study. J Ethnopharmacol. 2004 [acceso 29/11/23];90(1):99-103. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14698516/>
9. Luís Â, Duarte A, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of Eucalyptus globulus and Eucalyptus radiata essential oils. Ind Crops Prod. 2016 [acceso 29/11/23];79:274–82. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/c4c9798003db4d15be9502c9bb85978263d67aba>
10. Días LRC, Santos ARB, Filho ERP, da Silva PHS, Sobrinho CA. Óleo essencial de Lippia sidoides Cham (alecrim-pimenta) no controle de Macrophomina phaseolina em feijão-caupi. Rev Cuba Plantas Med. 2018 [acceso 29/11/23];24(1). Disponible en: <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/745>
11. Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, et al. Effect of an essential oilcontaining antiseptic mouthrinse on plaque and salivary Streptococcus mutans levels. J Clin Periodontol. 2000 [acceso 29/11/23];27(3):157–61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10743861>
12. Goldbeck JC, do Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentini ÂM, da Silva WP. Bioactivity of essential oils from Eucalyptus globulus and Eucalyptus urograndis against planktonic cells and biofilms of Streptococcus mutans. Ind Crops Prod. 2014 [acceso 29/11/23];60(60):304–9. Disponible en: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-4df73010-f2d8-39c6-802b-08761e7df3d5>
13. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol. 2001 [acceso 29/11/23];55(1):165-99. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11544353/>

14. Quinchuela CD, Vaca IA. Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya* (Orchidaceae) del Ecuador. [Tesis de Grado] [Quito, Ecuador]: Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador; 2020 [acceso 29/11/23]. Disponible en: [\[https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18435\]](https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18435)
15. Tolvino M, Frank R, Contreras SS, Dentista C, Roger F, Calle S, *et al.* 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. 2010 [acceso 29/11/23];20(1):19-24 Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4215/421539355004.pdf>
16. Alvis A, Arrazola G, Martínez W. Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de Cúrcuma (*Cúrcuma longa*). CIT Inform Tecnol. 2012 [acceso 29/11/23];23(2):11–8. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v23n2/art03.pdf>
17. Xiang Z, Li Z, Ren Z, Zeng J, Peng X, Li Y, *et al.* *EzrA*, a cell shape regulator contributing to biofilm formation and competitiveness in *Streptococcus mutans*. Mol Oral Microbiol. 2019 [acceso 29/11/23];34(5):194–208. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31287946/>
18. Banavar RS, Nirupad S, Chippagiri P, Pandurangappa R. Antibacterial effects of natural herbal extracts on streptococcus mutans: Can they be potential additives in dentifrices? Int J Dent. 2017 [acceso 29/11/23]:1–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29201054/>
19. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. Adv Colloid Interface Sci. 2018 [acceso 29/11/23];26:1–14. DOI: [10.1016/j.cis.2018.10.005](https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.10.005)
20. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2013 [acceso:29/11/23];10(3):313-9. Disponible en: <https://www.thejcdp.com/citation/DOC/3310>

21. Li X, Yin L, Ramage G, Li B, Tao Y, Zhi Q, *et al.* Assessing the impact of curcumin on dual-species biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Microbiology open*. 2019 [acceso 29/11/23];8(12). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31560838/>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: María del Pilar Acosta.

Curación de datos: María del Pilar Acosta, Sergio Fermín Benavides, Andrés Ignacio Rodríguez.

Análisis formal: María del Pilar Acosta, Sergio Fermín Benavides, Andrés Ignacio Rodríguez.

Investigación: María del Pilar Acosta.

Metodología: María del Pilar Acosta.

Administración del proyecto: María del Pilar Acosta.

Visualización: María del Pilar Acosta, Sergio Fermín Benavides, Andrés Ignacio Rodríguez.

Redacción del borrador original: María del Pilar Acosta, Sergio Fermín Benavides, Andrés Ignacio Rodríguez.

Redacción, revisión y edición: María del Pilar Acosta, Sergio Fermín Benavides, Andrés Ignacio Rodríguez.