

INHIBICIÓN DE *Helicobacter pylori* POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON *Mentha piperita*
QBP Karen Navarro Garza *, Dra. María Porfiria Barrón González ^{*1},
MC. Karla Leal López, Dr. Jorge Menchaca Arredondo **,
Dr. Ramón Rodríguez Garza *

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas*
y Facultad de Ciencias Físico Matemáticas**, Ciudad Universitaria,
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. CP.66455.

^{*1}maria.barrongn@uanl.edu.mx

RESUMEN

Helicobacter pylori es un microorganismo implicado en padecimientos gástricos, como gastritis, úlcera péptica y cáncer de estómago; el tratamiento de elección consiste en la administración de una combinación de fármacos y antibióticos inhibidores de la bomba de protones y sales de bismuto. Sin embargo esta bacteria ha desarrollado resistencia ante estos medicamentos, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos activos que inhiban su crecimiento y colonización. Las nanopartículas de plata (Np-Ag), en conjunto con extractos de plantas, se presentan como una alternativa a esta problemática. Las plantas han sido de gran interés debido a la composición tan abundante de sustancias que poseen y que han sido evaluadas contra diversos microorganismos patógenos, sobre los que mostraron su efectividad para inhibirlos. La síntesis de nanopartículas ha sido ampliamente establecida en los últimos años, para una gran diversidad de áreas y aplicaciones. Las nanopartículas elaboradas a partir de plata, son las más utilizadas. Sin embargo, el hecho de su producción a gran escala, implica técnicas que involucran el uso de compuestos químicos que finalmente generan graves problemas de contaminación ambiental. En la búsqueda de nuevos agentes reductores “amigables” al medio ambiente, para realizar la síntesis de nanopartículas, se han utilizado extractos vegetales, en lo que se conoce como síntesis verde. En este trabajo se evaluó el efecto de nanopartículas de plata, las cuales fueron funcionalizadas con extracto metanólico de *Mentha piperita* mediante síntesis verde sobre *H. pylori*. Para determinar la actividad biológica *in vitro* de las Np-Ag/*M. piperita* sobre los cultivos de *H. pylori*, se evaluaron dosis de 2,8, 1,4 y 0,92 mg/mL, se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 635 nm lo cual demostró que la dosis de 2,8 mg/mL inhibió el crecimiento de *H. pylori*, de igual forma fue posible observar un cambio en la morfología colonial de la bacteria. Asimismo, se realizó un *screening* fitoquímico al extracto metanólico de *M. piperita* para identificar los grupos funcionales.

Palabras clave: *Helicobacter pylori* * *Mentha piperita* * nanopartículas de plata

Introducción

La prevalencia de enfermedades infecciosas a nivel mundial, causadas principalmente por bacterias constituye un gran problema de salud pública. *Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa, causante de gastritis, cáncer de duodeno y estómago (Tanih, NF, *et al.*, 2010).

Varios medicamentos de corto plazo han sido prescritos para la erradicación de *H. pylori*, sin embargo, la resistencia emergente a los antibióticos, especialmente claritromicina y metronidazol limita su uso en el tratamiento de infecciones en países desarrollados y más aún, en países en vías de desarrollo (Sullivan *et al.*, 1990). El crecimiento de la resistencia a los antibióticos y las complicaciones específicas demandan la búsqueda de nuevos compuestos, especialmente de fuentes naturales como las plantas medicinales (Zahra, *et al.*, 2011).

Las plantas son una fuente potencial de agentes antimicrobianos usadas en diversos países. Tradicionalmente, los extractos vegetales crudos se utilizan como medicina herbal para el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas (Alviano, 2009). Por otra parte, existen compuestos como polifenoles, flavonoides y glucosinolatos que presentan propiedades bioactivas, atribuidas a los vegetales de los cuales se obtienen. A nivel mundial, se reporta cada vez más, una gran variedad de compuestos con actividad anti-*Helicobacter pylori in vitro*, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo* (Hideo Y., *et al.*, 2015)

Mentha piperita es una planta híbrida perenne descubierta por Mirtcham en el siglo XVII. Conocida comúnmente como “yerbabuena”, aunque son múltiples y variados los usos medicinales que se le atribuyen, la mayoría de ellos están destinados a resolver desórdenes de tipo digestivo como: acidez estomacal o agruras, bilis, coraje, estreñimiento, infección intestinal, gastritis y mal de estómago, por mencionar algunos. También es utilizada en afecciones contra parásitos intestinales. Las partes aéreas de la planta contienen una gran cantidad de aceites esenciales ricos en mentol y otros monoterpenos. La hierbabuena es una planta introducida a la medicina tradicional que goza de un gran prestigio para aliviar trastornos digestivos que involucran acidez estomacal, infección intestinal, diarrea y gastritis. Su efectividad en estos casos ha sido validada experimentalmente (Argueta, *et al.*, 1994).

Por otra parte, durante los últimos veinte años, las investigaciones en la síntesis de nanopartículas inorgánicas se han ido desarrollando rápidamente (Ozin, 1992). Entre las nanopartículas de metales nobles, las sintetizadas a partir de plata, son quizás las más reconocidas por sus diversas aplicaciones en una gran variedad de áreas.

La biosíntesis de nanopartículas ha recibido considerable atención debido a la necesidad de desarrollar tecnologías benéficas al ambiente en esta síntesis de materiales (Mandal, *et al.*, 2006). Aunque el uso de microorganismos en la síntesis de nanopartículas sigue siendo investigado, hoy en día, la sustitución de estos por partes o extractos de plantas mediante técnicas similares es un

área de investigación muy interesante y poco explorada, ya que la utilización de estos como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas, nos da esa ventaja sobre el ambiente.

La presente investigación está enfocada a la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Mentha piperita* sobre *H. pylori*, la realización de su síntesis y la caracterización de nanopartículas revestidas con el extracto vegetal.

HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *Mentha piperita* posee metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana sobre *Helicobacter pylori* y las nanopartículas de plata funcionalizadas con dicho extracto también presentan efecto anti-*H. pylori*.

Objetivo general

Establecer *in vitro* el efecto anti-*H. pylori* del extracto metanólico de *Mentha piperita* así como de nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico: *H. pylori*

Material vegetal: Una vez colectado el material vegetal se procesó de acuerdo con la metodología de Moreno Limón S, 2015.

Preparación de la solución madre del extracto vegetal: Se disolvió una cantidad conocida del extracto obtenido en cierto volumen de agua destilada estéril, hasta saturación, y a partir de esta solución madre, se realizaron los cálculos necesarios para obtener la concentración deseada.

Perfil fitoquímico de los extractos metanólicos: Al extracto metanólico de *M. piperita* se le realizó un análisis fitoquímico, de acuerdo con Domínguez X, 1973, con la finalidad de identificar sus componentes químicos.

Helicobacter pylori

Mantenimiento de las bacterias: La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Biología Celular y fue conservada y mantenida en refrigeración. Para su uso, se requería su activación en caldo de cultivo Brucella por 24 h a 37 °C, repitiendo este procedimiento durante tres días.

Cinética de crecimiento: Se prepararon 9 tubos que contenían caldo de cultivo Brucella con un volumen de 5 mL y un inóculo de 75 µL de bacterias, se incubaron a 37 °C y se determinó la absorbancia a 635 nm de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro durante 24 h.

Evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de *M. Piperita* sobre *H. pylori*: Se empleó ceftriaxona como control negativo y metanol como control positivo. La prueba se corrió por triplicado, empleando una serie de tubos que contenían 5 mL de caldo *Brucella*, en el cual se agregaron las dosis de 5, 10 y 15 mg/mL del extracto metanólico de *M. piperita*. Se inocularon 75 µL de cepa que se encontraba a la mitad de la fase logarítmica de crecimiento, se incubó a 37 °C por 24 h, y se leyó la absorbancia a 635 nm.

Elaboración de nanopartículas de plata con los extractos vegetales (Np-

Ag/EM-M- piperita) y evaluación sobre *H. pylori*: Se colocó en un vaso de precipitados 0,25 g del extracto vegetal, se diluyó en 100 mL de agua purificada. Se preparó una solución de nitrato de plata 0,002 M, la cual se agregó gota a gota a la mezcla del extracto hasta completar un volumen de 10 mL; esto se realizó en constante agitación y a temperatura ambiente. Al terminar el volumen, la mezcla en agitación se dejó de 15 a 30 minutos para finalmente centrifugar. Para la determinación del efecto de las nanopartículas sobre la bacteria se emplearon 9 tubos de ensayo con caldo *Brucella* a los cuales se les depositó un inóculo de 75 μ L del cultivo; posteriormente se añadieron las nanopartículas de plata funcionalizadas a tres concentraciones (2,8, 1,4 y 0,92 mg/mL) y se incubaron a 37 °C por 48 h.

Resultados

Determinación de Grupos funcionales: En la Tabla I, se observan los resultados realizados al extracto metanólico de *M. piperita*, de acuerdo con Domínguez X., 1973. El extracto metanólico de *M. piperita* presenta los siguientes grupos funcionales: esteroides y triterpenos, carbohidratos, alcaloides y presenta insaturaciones.

Tabla I.- Pruebas fitoquímicas para *M. piperita*.

Grupo funcional	Prueba	Reacción
Insaturaciones	KMnO ₄	+
Grupo carbonilo	2,4-dinitrofenilhidracina	+
Oxidrilos fenólicos	FeCl ₃	+
Flavonoides	H ₂ SO ₄	+
Esteroides y triterpenos	Salkowsky	-
Carbohidratos	Molish	+
	Cumarinas	+
	Lactonas	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	+
Alcaloides	Dragendorff	+
Saponinas (NaHCO ₃)	Bicarbonato de sodio	+
Aromaticidad	H ₂ SO ₄ .formaldehído	+

Actividad biológica del extracto metanólico de *M. piperita* sobre *H. pylori*:

Se evaluaron 1, 5, 10 y 15 mg/mL del extracto metanólico de *M. piperita* y en la Figura 1 se observa que el cultivo de *H. pylori* mostró una absorbancia de 0,324 nm, el control positivo (ceftriaxona) a una concentración de 10 mg/mL presentó una absorbancia de 0,079 nm, y el extracto metanólico a 10 mg/mL presentó una absorbancia de 0,14 mg/mL. Las dosis de 1 y 5 mg/mL presentaron absorbancia superior a la del cultivo control de *H. pylori* (Fig. 1).

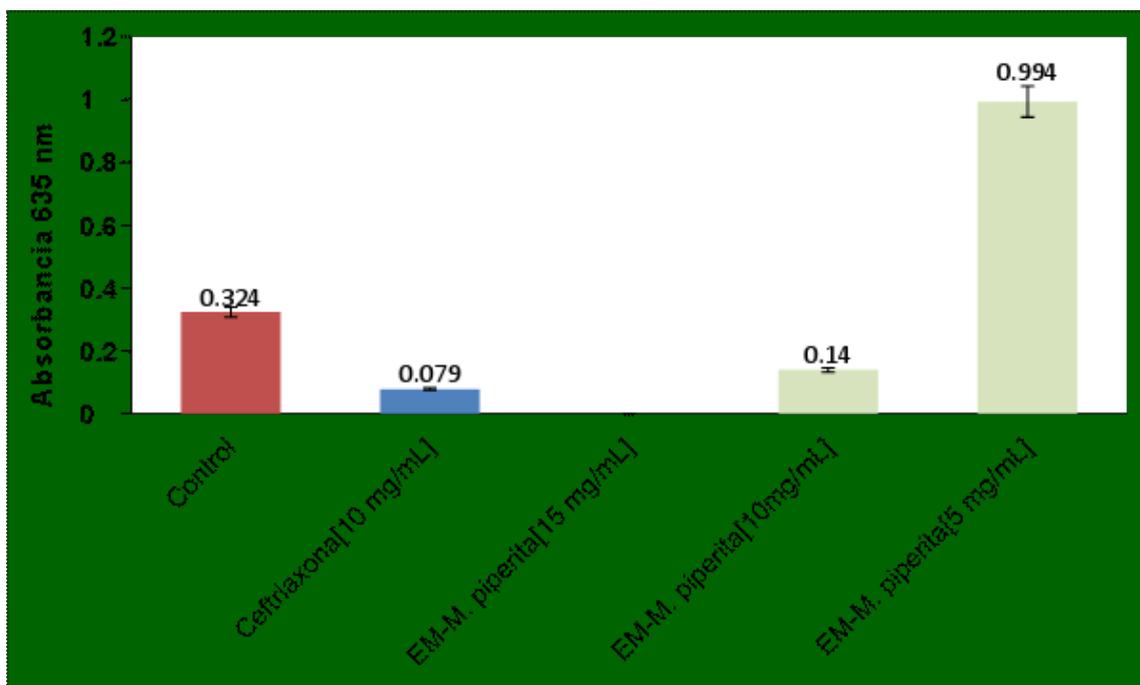


Figura 1.- Actividad biológica del extracto metanólico de *M. piperita* sobre *H. pylori*. Comparación de la absorbancia que presentó el cultivo de *H. pylori* en el control de cultivo (barra roja) (0,324 nm), el cultivo en presencia de 10 mg/mL de ceftriaxona (0,079 nm) (barra azul), y el cultivo en presencia de 10 mg/mL del extracto metanólico de *M. piperita* (0,14 nm) (barra verde). Este extracto, a la dosis de 5 mg/mL, no inhibió el cultivo de *H. pylori*.

Actividad biológica de Np-Ag/EM-M- *piperita* sobre *H. pylori*: En la Figura 2 se muestra la imagen correspondiente al cultivo de *H. pylori* en presencia de las nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *M. piperita* (Np-Ag/EM-M. *piperita*), en el cual se observa la inhibición del cultivo y la inhibición de la formación del *biofilm* característico de un cultivo sano de *H. pylori*. Esta actividad inhibitoria se aprecia a la dosis de 2,8 mg/mL de Np-Ag/EM- *M. piperita*.

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria implicada en diversos padecimientos de tipo digestivo. Actualmente, el tratamiento consiste en la administración de una combinación de fármacos y antibióticos. Sin embargo, debido a la aparición de resistencia bacteriana a estas moléculas es necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos más eficaces que los antibióticos y que además se puedan sintetizar de manera sencilla. Es por eso que las nanopartículas de plata funcionalizadas con extractos vegetales se presentan como una alternativa a esta problemática.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sugiere que los iones Ag^+ alteran la permeabilidad celular y otras funciones de la bacteria. La dosis que presentó mayor efecto corresponde a 2,8 mg/mL, en la cual se aprecian

cambios importantes como lo es la inhibición de *biofilm*, un mecanismo de resistencia característico de *H. pylori* (Hideo Y., *et al.*, 2015)

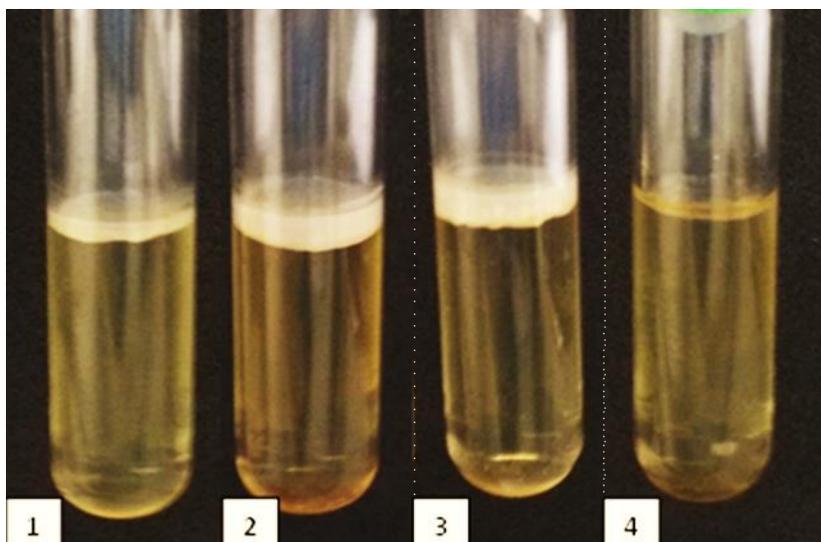


Figura 2.- Actividad biológica de nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *M. piperita* sobre *H. pylori*. La imagen 1) corresponde al cultivo control de *H. pylori*, las imágenes de los tubos 2, 3 y 4 corresponden a cultivos de *H. pylori* en presencia de nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *M. piperita*, a las dosis de 0,92 mg/mL, 1,4 mg/mL y 2,8 mg/mL respectivamente. A la dosis de 2,8 mg/mL se observó la inhibición de la formación del *biofilm* característico de un cultivo sano de *H. pylori*.

Los grupos funcionales que, de acuerdo con la metodología de Domínguez, X, 1973, se detectaron en el extracto metanólico de *M. piperita* fueron insaturaciones, grupos carbonilo, oxhidrilos fenólicos, flavonoides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, alcaloides, saponinas y grupos aromáticos. No se identificaron triterpenos, pero sí se detectó la presencia de flavonoides (Para S., *et al.*, 2013).

Conclusiones

- El extracto metanólico de *M. piperita* inhibe el crecimiento de *H. pylori*
- Las nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *M. piperita* inhiben el crecimiento y la formación de *biofilm* de *H. pylori*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alviano DS, Alviano CS. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2009; 10: 106–21.

Argueta Villamar A, Cano Asseleih LM, Rodarte ML: Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista. 1994.

Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sankar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 69:485–92.

Moreno-Limón S, Barrón-González MP, Martínez-Herrera I, Quiñones-Gutiérrez Y, Menchaca-Arredondo JL, Rodríguez-Garza RG. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by methanolic extract of *Stenocereus marginatus* and *Castela texana*. *International Journal of Medicinal Plants and Alternative Medicine* 2015; 3: 10-7.

Domínguez XA. Métodos de Investigación Fitoquímica. México DF: Ed. Limusa. 1973.

Ozin GA. Nanochemistry: synthesis in diminishing dimensions, *Adv Mater* 1992; 4: 612–49.

Yonezawa H, Osak T, Kamiya S, Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance. *BioMed Research International* 2015; Article ID 914791.

Para S, Thulasi Muneppa Sridhar, Penchalaneni J, Challagundla Varadarajulu N. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Mentha piperita* L. (peppermint). An important multipurpose medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences* 2013; 4: 77-83.

Sullivan PB, Thomas JE, Wight DG *et. al.* *H. pylori* infection in Gambian children with chronic diarrhea and malnutrition. *Archives of Disease in Childhood* 1990; 65: 189-91.

Tanih NF, Okeleye BI, Naido N. Marked susceptibility of South African *Helicobacter pylori* strains to ciprofloxacin and amoxicillin: Clinical implication. *S Afr Med J* 2010; 100: 49-52.

Zahra Hosseininejad, Sodaif Darvish Moghadam, Farzaneh Ebrahimi, Mohammad Abdollahi, Mohammad Javad Zahedi, Mahdieh Nazari, Mehdi Hayatbakhsh, Saeed Adeli y Fariba Sharififar. *In vitro* screening of selected Iranian medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Green Pharmacy* 2011; 5. p. 282-85.