

INHIBICIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* POR *Cinnamomum verum* E *Illicium verum*

Melendez Anzures F.E.^a, Barrón González M.P.^{a*}, Rodríguez Garza R.G.^a, Morales Vallarta M.R.^a y Elizondo Herrera A^a.

a) Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular y Genética, Laboratorio de Biología Celular, Cuerpo Académico de Biología Celular y Genética. Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. *
maria.barrongn@uanl.edu.mx / porfi_bagzz@yahoo.com.mx

RESUMEN

Las plantas medicinales han sido empleadas por el humano como alternativa o complemento a los tratamientos contra diversas afecciones, entre ellas la periodontitis, se ha reportado que alimentos como *Cinnamomum verum* e *Illicium verum* tienen compuestos con actividad antimicrobiana. Por otra parte, la periodontitis es una enfermedad de origen bacteriano, que afecta de un 5%-20% de los adultos entre 30 y 60 años a nivel mundial. Una de las bacterias implicadas en la periodontitis crónica y agresiva además de ser considerada como su principal agente etiológico es *Porphyromonas gingivalis*. El objetivo de éste trabajo fue determinar la actividad biológica del extracto metanólico de *I. verum* y extracto acuoso de *Cinnamomum verum* sobre *P. gingivalis*. Los resultados indican que los extractos evaluados de *C. verum* e *I. verum* inhiben el crecimiento *in vitro* de *P. gingivalis*. Estos resultados brindan perspectivas de estudio encaminadas a la búsqueda de nuevas alternativas de terapia antimicrobiana relacionadas con enfermedades periodontales.

ABSTRACT

The human race has used various medicinal plants as an alternative or complement to the treatments for various diseases, including periodontitis. It has been reported that food as, *Cinnamomum verum* and *Illicium verum* containing compounds with antimicrobial activity. Periodontitis is a bacterial disease that affects 5% -20% of adults between 30 and 60 years around the world. One of the bacteria involved in chronic and aggressive periodontitis and is considered as the main causative agent is *P. gingivalis*. The objective of this study was to determine the biological activity of the methanol extract of *Illicium verum* and aqueous extract of *Cinnamomum verum* in *Porphyromonas gingivalis*. The results indicate that the extracts of *C. verum* and *I. Verum* show biological activity in *P. gingivalis*. These study results provide perspectives on the way to finding new alternative antimicrobial therapy related to periodontal diseases.

Palabras clave:

Porphyromonas gingivalis, *Illicium verum*, *Cinnamomum verum*

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

A. Extractos vegetales

El uso de las plantas medicinales es una de las actividades más antiguas del hombre. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, diariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele, 1993). Las plantas medicinales de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud en el 2007, se define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyo principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Debido al uso indiscriminado de antibióticos en la actualidad, se ha generado una resistencia de los microorganismos patógenos a dichos agentes bactericidas. Esto ha despertado el interés y la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamientos de la medicina natural, que sean más eficaces contra bacterias y hongos, que son los principales agentes que desencadenan infecciones en humanos.

B. Periodontitis

El término periodontitis, se utiliza para definir la inflamación de los tejidos de soporte del diente, habitualmente un cambio progresivamente destructivo, con pérdida de hueso y ligamento periodontal, por extensión de la inflamación desde la encía. Es una enfermedad de origen bacteriano, que afecta a un 5%-20% de los adultos entre 30 y 60 años a nivel mundial (Liébana, J., 2002; OMS, 2007). En México la enfermedad periodontal es una de las principales enfermedades en salud bucal y el factor etiológico primordial es la placa dentobacteriana resultando en la pérdida de las piezas dentales en sus etapas terminales. (Gay-Escoda C., 2004). La periodontitis es una enfermedad difícil de tratar, ya que las bacterias patógenas se encapsulan en una matriz extracelular por lo que son inaccesibles tanto a los mecanismos efectores del sistema inmunitario como al tratamiento antibiótico. La única forma conocida para acabar con la periodontitis requiere de un tratamiento odontológico, no obstante, se pueden utilizar plantas medicinales de forma complementaria para la higiene bucal, mediante plantas astringentes, antisépticas, antiinflamatorias y cicatrizantes, entre otras (Murillo, *et al*, 2007). La periodontitis se puede volver enfermedad sistémica ya que se relaciona con diabetes, enfermedades cardiovasculares y pulmonares y alteraciones en el embarazo (Gay-Escoda C., 2004).

C. *Porphyromonas gingivalis*

Moreno y Contreras en el 2013, citan que *Porphyromonas gingivalis* es un cocobacilo, Gram negativo, anaerobio, no móvil, asacarolítico, con actividad proteolítica. Shah HN, *et al.*, en 1988 afirman que *P. gingivalis* es un bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 - 0.8 μm x 1 - 3.5 μm . Liébana, en el 2002, menciona que *P. gingivalis* no se considera como parte integrante de la microbiota oral normal sino como un patógeno exógeno ausente en individuos sanos. Se le relaciona con multitud de procesos patológicos: gingivitis, pulpitis, abscesos periodontales y periapicales, etc., pero su asociación más importante es con la destrucción y progresión de algunos tipos de periodontitis. Moreno y Contreras en el 2013,

describen que *P. gingivalis* cuenta con una serie de factores de virulencia importantes para su persistencia dentro de los tejidos y su resistencia al tratamiento, que le permiten, primero iniciar el proceso infeccioso a través de mecanismos como la colonización, invasión y replicación dentro de las células epiteliales y fibroblastos, y luego, evadir y manipular el sistema inmune del huésped y de esta forma establecer una infección crónica y por último destruir los tejidos del huésped por medio de varias proteasas, colagenasas y enzimas. Estudiar estos factores de virulencia es muy importante para comprender el papel de este patógeno en el desarrollo y establecimiento de la enfermedad periodontal y reconocer la importancia del control microbiológico para alcanzar el éxito en la terapia periodontal.

En base a la información obtenida, en este trabajo se evaluó la actividad biológica del extracto metanólico de *I. verum* y extracto acuoso de *C. verum* sobre *P. gingivalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Extractos vegetales: Se utilizó el extracto metanólico de *I. verum* (fruto entero) y el extracto acuoso de *C. verum* (corteza entera).

Métodos de Extracción: *Illicium verum* fue procesados por extracción metanólica, en un matraz Erlenmeyer de 500mL se colocó el material vegetal triturado, agregando metanol absoluto y se mantuvo en agitación constante con ayuda de un agitador shaker por 14 días a temperatura ambiente, después de este tiempo se filtró la solución obtenida empleando filtros Whatman No. 3, el filtrado se dejó evaporar hasta sequedad en un Rotavapor a 65°C posteriormente, se obtuvo el extracto, raspando completamente todos los residuos vegetales con una espátula estéril y se almacenó en frascos viales estériles con tapón de rosca, en oscuridad y congelación hasta su uso.

Métodos de Extracción Acuosa: *Cinnamomum verum* fue procesada por extracción acuosa, en un matraz Erlenmeyer, se colocaron 200mg de corteza entera de *C. verum* en 850mL de agua desionizada hirviendo, obteniendo el extracto a manera de té durante 30 minutos, después de este tiempo se filtró el extracto en filtros Whatman No. 1, el filtrado se dejó evaporar hasta sequedad en una estufa de secado ajustada a una temperatura de 37°C durante quince días, se obtuvo el extracto, raspando completamente todos los residuos vegetales con una espátula estéril y se almacenó en frascos viales estériles con tapón de rosca, en oscuridad y congelación hasta su uso.

Elaboración de la Soluciones madre: Se realizan los cálculos correspondientes para las 4 diferentes dosis que se evaluaron sobre *P. gingivalis* [0.1, 1 ,7 y 10mg/mL], posteriormente en condiciones de esterilidad, se pesaron los gramos previamente calculados en una balanza analítica, a continuación se disolvieron en medio de cultivo MPT caldo.

Toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*: En éste proyecto se realizó esta determinación para obtener una DL₅₀ de cada uno de los extractos vegetales, aquellos que presentaron una DL₅₀<1000 ppm es probable que contengan uno o varios compuestos tóxicamente activos. Se determinó la DL₅₀ con un análisis estadístico de regresión Probit con el paquete SPSS.

II. *Porphyromonas gingivalis*: La cepa de *P. gingivalis* fue obtenida por el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Se realizó una cinética de crecimiento a *P. gingivalis*, agregando a 9 tubos de 13x100mm con un volumen de 5mL medio de medio de cultivo MPT caldo estéril, un inóculo de 30µL de bacteria, posteriormente se incubaron a 37°C. Se determinó la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro cada hora hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento bacteriano de *P. gingivalis* (datos no mostrados).

III. Bioensayos: El extracto metanólico de *I. verum* y el extracto acuoso de *C.verum* sobre *P. gingivalis* se evaluó a cuatro concentraciones [0.1, 1, 7 y 10mg/mL], cada ensayo se repitió cuatro veces. Se realizó empleando tubos de 13x100 mL, los cuales contenían 5 mL de medio de cultivo. Los tubos se incubaron 24hs a 37°C. Posteriormente se leyó la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro marca GENESYS™, a 635nm. Posteriormente se graficaron los resultados obtenidos, y se realizó la determinación de las UFC/mL por la técnica de Recuento Bacteriano en Placa. Como control negativo se empleó la droga tetraciclina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad biológica del extracto metanólico de *I. verum* y el extracto acuoso de *C. verum* a la concentración de 7mg/mL muestran inhibición sobre *P. gingivalis* tanto en el análisis espectrofotométrico (Fig. 1), y en la cuantificación de UFC/mL (Fig. 1), siendo esta la mejor dosis inhibitoria sobre *P. gingivalis* de los extractos evaluados. La concentración de extractos que presentó menor inhibición por el método de análisis espectrofotométrico sobre *P. gingivalis* fue 1mg/mL para ambos extractos.

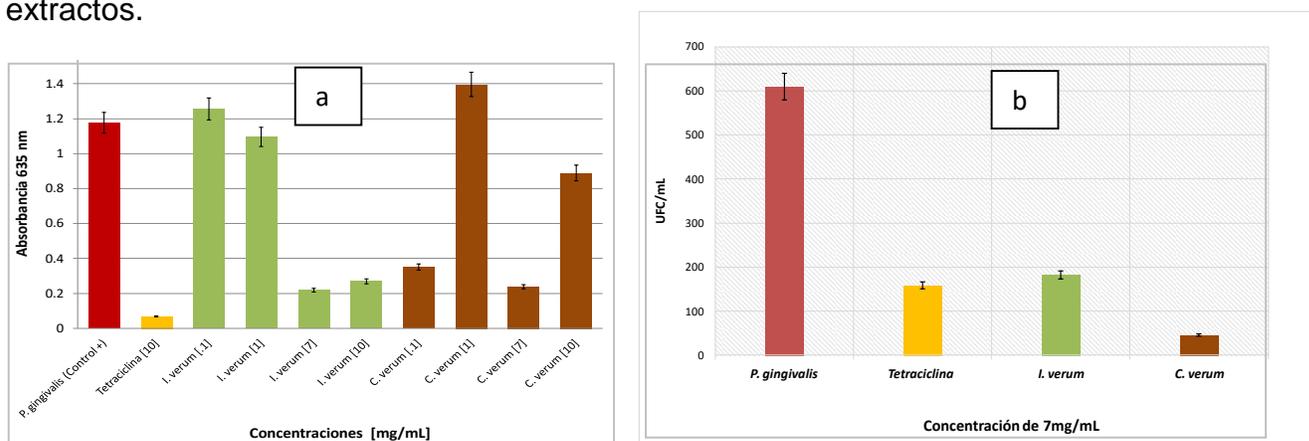


Figura 1.- Comparación de la actividad biológica de los extractos vegetales sobre *P. gingivalis* por el método espectrofotométrico (a) y por el método de RBP (b).

En cuanto a la determinación de la actividad tóxica, se observó que el extracto metanólico de *I. verum*, presentó actividad tóxica sobre *A. salina*, mostrando diferencia significativa con respecto al extracto acuoso de *C. verum* (Tabla I).

Tabla I
Actividad de los extractos sobre la letalidad de nauplios de *A. salina*

Especie	Extractos	DL ₅₀ (µg/mL)	X ²	P
<i>C. verum</i>	Acuoso	4,066.11	22.88	0.739
<i>I. verum</i>	Metanólico	604.05	730.55	0.000
Dicromato de Potasio	--	23.68 ± 3.78	2.538	0.281

X²= Chi cuadrada P= Significancia

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda seguir con más estudios sobre el efecto biológico que tienen éstos y otros extractos vegetales sobre bacterias implicadas en la enfermedad periodontal para la búsqueda de nuevas alternativas de terapia antimicrobiana que ayuden a mejorar las prácticas de manejo para la atención del paciente con enfermedad periodontal.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerele O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud, 14:390-395.
- Gay-Escoda C, BeriniAytés L, (2004). Tratado de Cirugía Bucal. Tomo I. Madrid: Ergon.
- Germano F, Bramanti E, Arcuri C, Cecchetti F, Cicciù M. Atomic Force Microscopy of bacteria from periodontal subgingival biofilm: Preliminary study results. Eur J Dent 2013; Vol.7:152-158.
- Liébana J. 2002. Bacterias anaerobias estrictas de interés oral (2) anaerobios no esporulados. En Microbiología Oral, Editorial McGraw-Hill Interamericana. España, pp. 375-386.
- Martín del Campo, R. 1976. Consideraciones acerca de las plantas medicinales mexicanas y su posible proyección mundial en estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. IMEPLAN. México, p.102
- Moreno S., Contreras A. 2013. Factores de Virulencia de *Porphyromonas gingivalis*. Fundación Juan José Carraro, Vol. 37, pp. 16-27
- Murillo Rodríguez, Antonio; Canto Pingarón, Mariano y Ortíz Camarero, Luis. (2007). Tratamiento desinflamatorio básico en Periodontitis Crónica localizada. Utilización de Oraqix, Gel Anestésico Periodontal como alternativa anestésica. ©DENTSPLY. España y Portugal.

- O.M.S. 2007. Salud Bucodental, de Organización Mundial de la Salud, [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/> [Revisado el 12 de Marzo de 2014]
- Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides assaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromona*. Int J Syst Bacteriol 1988; 38(1): 128-131.