

EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO ANTIBACTERIAL ENTRE 2 EXTRACTO DE *S. AROMATICUM* Y *H. LONGIPES*

Oliveros García Rojas Elena Itzel (1) Bustos Gómez Chrystyan Iván (2)

1 [Bachillerato general en ciencias experimentales, Escuela de Nivel Medio Superior de Irapuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [lenarojas3@gmail.com]

2 [Laboratorio de biología, Escuela de Nivel Medio Superior, Irapuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ci.bustos@ugto.mx]

Resumen

La cavidad oral es una de las zonas anatómicas de nuestro organismo con mayor número y variedad de bacterias aerobias y anaerobias. El equilibrio de este ecosistema se puede ver perturbado por factores que modifiquen el medio, y provoca que algunas especies predominen sobre otras en un hábitat determinado. Hablar de infección mixta de la cavidad oral supone referirnos al carácter endógeno y oportunista que protagonizan las bacterias aerobias y anaerobias que intervienen en mayor o menor medida. Se ha observado que estas infecciones son producidas por organismos como *Porphyromonas*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* entre otros. En la actualidad existen diferentes tratamientos para combatir este tipo de infecciones, entre ellas se encuentra el uso de extractos de planta con propiedades bactericidas y analgésicas que además pueden actuar en conjunto potenciando su efecto frente a algún patógeno en particular. Se obtuvieron los extractos de *S. aromaticum* y *H. longipes* y fueron sometidos a pruebas de inhibición bacteriana en medios de cultivo en placa los cuales presentaron un efecto sinérgico de tipo sumativo frente a *Lactobacillus Acidophilus* agente responsable de la descalcificación dental y la formación de caries.

Abstract

The oral cavity is one of the anatomical areas of our body with a greater number and variety of aerobic and anaerobic bacteria. The balance of this ecosystem can be disturbed by factors that modify the environment, and cause some predominant species over others in a given habitat. To speak of mixed infection of the oral cavity, to refer to the endogenous and opportunistic character that the aerobic and anaerobic bacteria play in a greater or lesser degree. It has been observed that these infections are produced by organisms such as *Porphyromonas*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* among others. Currently there are different treatments to combat this type of infection, among them is the use of plant extracts with bactericidal and analgesic properties that can act together enhancing their effect against some type of pathogen in particular. The extracts of *S. aromaticum* and *H. longipes* were obtained and they were subjected to tests of bacterial inhibition in plaque culture media which presented a slight synergistic effect against *Lactobacillus Acidophilus* agent responsible for dental decalcification and caries formation.

Palabras Clave

Alcamidas; Anestésico; Eugenol; Bactericida; inhibición

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano está constantemente acompañado por una gran biota bacteriana que forma relaciones simbióticas o de tipo comensal, la cavidad oral es una de las regiones anatómicas más abundantes de microorganismos debido al paso y procesamiento de nutrientes estableciendo así un complejo consorcio de especies que habitan este espacio [1] estos organismos pueden ser de tipo aerobios o anaerobios y tener diferencias morfológicas y metabólicas que ayudan a su identificación. La caries y la periodontitis son enfermedades bucales de mayor incidencia a nivel mundial y se han convertido en un problema de salud pública, estas afecciones están determinadas por la presencia de diferentes organismos del género *Streptococcus*, *Lactobacillus*, y *Actinomyces* entre otros organismos [2]. Existen principios activos que pueden ser extraídos de plantas y semillas con propiedades farmacológicas para el tratamiento de estas infecciones. La *H. longipes* es una especie de la familia Asteraceae endémica de México y se ha utilizado en la medicina tradicional por el alto contenido de alcanoides en sus raíces, entre ellas la afinina que es la alcanoides mayoritaria y principal responsable de los efectos biológicos como anestésico local, actividad insecticida y bactericida. La afinina es un alcanoides y se ha descubierto que pueden inhibir la producción de prostaglandinas el contacto con sus receptores, produce un efecto analgésico [3].

El Eugenol es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo, que es utilizado desde hace varios siglos en la práctica odontológica. También puede extraerse de pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites. Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con aroma característico, poco soluble en agua y soluble en alcohol, es un bloqueador irreversible de la conducción nerviosa y en concentraciones bajas, es capaz de reducir la transmisión sináptica de la zona neuromuscular. Varios estudios han concluido que el Eugenol inhibe la ciclooxigenasa, favoreciendo el efecto analgésico y anestésico al lograr la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. En altas concentraciones tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas, lo que resulta en daño a la membrana celular. Los resultados sugieren que el Eugenol inhibe el crecimiento de varios organismos patógenos, ya sea solo o combinado, que pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas orales [4]. La interacción entre 2 principios activos se produce cuando la actividad de un fármaco se ve alterado por otro, este tipo de interacción puede ser clasificado como interacción sinérgica cuando el efecto se incrementa o de antagonismo cuando el efecto disminuye

En este presente proyecto evaluaremos el efecto sinérgico antibacterial entre los extractos de *S. aromaticum* y *H. longipes*, para un mayor efecto con duración prolongada. El cual se espera que tenga una interacción sinérgica de suma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta vegetal y obtención de extractos

El material vegetal de *H. longipes* se colectó en el huerto localizado en el poblado de "Rio Chico" (Log.100.045278Lat. 21.309167) del municipio de Xichú ubicado en la Sierra Gorda de Guanajuato durante el verano. Se realizó la identificación de acuerdo a la descripción taxonómica referida por Rzedowski. Se realizó una separación en cada uno de sus órganos; Para la realización del extracto se seleccionó únicamente la raíz, se lavó y seccionó en porciones de 0.5 cm. Se pesó 10 gr de materia vegetal, se adicionaron 100 ml de alcohol etílico absoluto grado reactivo (99.5%); por su parte las muestras de *S. aromaticum* fueron compradas en el expendio de semillas de la central de abastos de la ciudad de Irapuato, a continuación, se pesaron 10 gr de clavo y se dejaron macerar en 100 ml de éter de petróleo. posteriormente ambas muestras se trituraron por 1 hr en mortero. Se dejaron en maceración por 7 días. La materia orgánica y los extractos crudos fueron separados por decantación, para separar las partículas más pequeñas de las muestras se utilizó una centrifuga a 2500 rpm (C818-PowerSpin). Después, las muestras fueron evaporadas y concentradas en un parilla caliente con agitación magnética (Scorpion scientific) a $75\pm 5^{\circ}\text{C}$

Cultivo, asilamiento e identificación de bacterias

Para realizar el cultivo de microorganismos se prepararon medios de cultivo semisólido de agar soya Tripticaseina, en un 1 L de agua destilada, se agregaron 40 g del agar, posteriormente se sometió a un proceso de esterilización en el autoclave a 127 C 1.5kg/cm³ durante 20 min. Una vez solidificados los medios de cultivo se seleccionaron 10 personas con signos clínicos de caries y periodontitis y se realizó un raspado faríngeo y se cultivaron en las placas, se dejaron incubar los medios por 24 hr a 37 °C. Después se seleccionaron 2 colonias bacterianas para su clasificación y con un asa de nicromo se tomaron muestras de colonias aisladas y se cultivaron en medio de cultivo agar sangre para observar la presencia de hemolisis y aunado a esto se realizó la prueba de la catalasa; Por últimos, se realizó la identificación de la morfología bacteriana mediante la técnica de tinción de Gram, además de que podían distinguir entre bacterias gram positivas y negativas

Determinación de halos de inhibición

Para poder comprobar su efecto antibacterial se prepararon diferentes concentraciones de los extractos por separado en 2 series, las cuales 3 fueron de afinina (75%, 50%, 25%), 3 de eugenol (75%, 50%, 25%), y de afinina y eugenol a una concentración 1-1 de 600 µL- 600 µL, en los cuales se utilizaron círculos de papel filtro impregnado con las soluciones con 8 repeticiones cada una, después se inocularon nuevas placas de agar sangre con la bacteria seleccionada y se dejaron incubar a 37°C por 24 hr. Se midieron y promediaron los radios obtenidos y se realizó un análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de la evaporación y eliminación del solvente de los extractos de *S. aromaticum* y *H. longipes* se obtuvieron 2 ml y 1.5 ml de extracto concentrado respectivamente, que corresponden a las concentraciones obtenidas anteriormente por otros metodologías de extracción imagen 1.

Una vez obtenidos los extractos se procedió al aislamiento y clasificación de las bacterias a partir de los raspados faríngeos, debido a que se obtuvieron una gran cantidad de colonias bacterianas con diferentes morfologías se seleccionó solo una y se aisló en agar sangre para evaluar el efecto de los extractos

La morfología que presentaron las colonias bacterianas seleccionadas era de tipo circular con borde irregular y ondulado, presenta una elevación de tipo convexa y con una consistencia cremosa de color blanca imagen 2.

Consecutivamente se realizó la tinción Gram de estas mismas colonias y se observaron a 40X y 100X en un microscopio carl zeiss (mod. primo star) logrando determinar que se trataban de streptobacillus gram positivos imagen 3

Después de cultivar una serie de colonias aisladas se determino que estos bacilos no generan hemolisis el medio de cultivo agar sangre y adicionalmente resultaban negativos en la prueba de la catalasa.

IMAGEN 2: Morfología de las colonias aisladas de *Lactobacillus sp*

IMAGEN 1: Extracto crudo de eugenol a partir de *S. aromaticum*

IMAGEN 3: tinción de Gram a 100X

Una vez obtenidos estos resultados se revisaron diferentes fuentes bibliográficas y se determinó por sus características morfológicas de colonia, morfología bacteriana, crecimiento de agar sangre y negativo para pruebas de catalasa de determino que se trataba de *Lactobacillus* sp, especie responsable en algunos procesos infecciosos bucales aunque no es privativo de esta especie si es parte de un sistema multifactorial.

Ya habiendo clasificado la cepa se disolvieron los extractos etanolicos de afinina y eugenol en las diferentes concentraciones por separado y una serie en proporción 1:1 a continuación se presentan los resultados obtenidos de las repeticiones realizadas tabla 1.

Tabla 1: Resultados de halos de inhibición.

n= 56	Eugenol 75%	Eugenol 50%	Eugenol 25%	Afinina 75%	Afinina 50%	Afinina 25%	Afinina y Eugenol
	□	□	□	□	□	□	□
Halos de inhibición en mm	0.38	0.38	0.34	0.31	0.40	0.18	0.60
SD	0.06	0.08	0.05	0.07	0.08	0.10	0.15

Como es posible observar en la tabla anterior existe una mayor inhibición del crecimiento bacteriano en la mezcla de afinina y eugenol respecto a las concentraciones individuales de los principios activos. La interacción de la mezcla afinina –eugenol inhibió un 36% y 33% el crecimiento bacteriano en comparación a la solución de eugenol y la solución de afinina respectivamente. Es importante aclarar que si bien existe una inhibición positiva de las bacterias por acción sinérgica de los extractos no es muy pronunciada y de acuerdo a los resultados obtenidos se puede argumentar que la clase de interacción sinérgica que se lleva a cabo es de tipo sumativa. Como futuros campos de estudio es necesario verificar la inhibición de estos extractos en otros organismos presentes en estas infecciones ya que se presentan en forma de consorcios bacterianos.

CONCLUSIONES

Existe una interacción farmacológica entre los extractos de afinina y eugenol de tipo sinérgica sumativa en la inhibición positiva de *Lactobacillus* sp que se han identificado como agentes responsables de la caries y periodontitis en conjunción con otros organismos en consorcios bacterianos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del POA 2018 y logístico recibido por el personal y directivos de la ENMSI ya que hicieron posible este trabajo de investigación

REFERENCIAS

[1] Valle Rodríguez JL, Gómez-Lus Centelles ML, Prieto Prieto J, Liébana Ureña J. Composición y ecología de la microbiota oral. En: Liébana Ureña J, editor. Microbiología oral. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1995; p. 402-7.

- [2] Mouton C, Robert JC. Principales bacterias orales. En: Mouton C, Robert JC, editores. Bacteriología bucodental. Barcelona: Masson, 1995; p. 49-87.
- [3] García A., Ramírez E. & Molina J. (2004) El género *Heliopsis* (heliantheae; asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces, *Acta Botanica Mexicana* 69: 115-131 (2004)
- [4] AFPD. 2008. African Flowering Plants Database - Base de Donnees des Plantes a Fleurs D'Afrique.