



Valoración al microscopio de fuerza atómica de la actividad biológica de *Cinnamomum verum* sobre *Porphyromonas gingivalis*

María Porfiria Barrón-González*, Frank Eduardo Meléndez-Anzures, Valeria Alejandra Medina-Ortiz, Beatriz Licea-Guajardo, Yadira Qiñones-Gutiérrez, Ramón Gerardo Rodríguez-Garza, Daniel Julio Eguiarte-Lara.



*maria.barrongn@uanl.edu.mx

Resumen

La humanidad ha empleado diversas plantas medicinales como alternativa o complemento a los tratamientos contra diversas afecciones entre ellas la periodontitis. Se ha reportado en diversas investigaciones que las plantas como *Castela texana* y *Cinnamomum verum*, contienen compuestos con actividad antimicrobiana. 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. Una de las bacterias implicadas en la periodontitis crónica y agresiva además de ser considerada como su principal agente etiológico es *P. gingivalis*. Este microorganismo cuenta con factores de virulencia que le proveen un gran potencial para colonizar e invadir tejidos periodontales, modular la respuesta inmune del huésped, permitiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica, y colaborar con los procesos de destrucción de tejido periodontal y hueso alveolar. El objetivo de este trabajo fue: Determinar la actividad biológica de los extractos acuoso de *C. verum*; y la actividad farmacológica de tetraciclina sobre el crecimiento *in vitro* de *P. gingivalis* y caracterizar los cambios en las propiedades nanomecánicas de este microorganismo por Microscopía de Fuerza Atómica (MFA). Los resultados indican que el extracto acuoso de *C. verum* inhibe en un 92% el crecimiento *in vitro* de *P. gingivalis*, por otra parte, la Microscopía de Fuerza Atómica nos permitió estudiar, caracterizar y analizar las propiedades morfológicas y nanomecánicas de *P. gingivalis* proporcionándonos información que puede ser útil para comprender mejor el papel de las interacciones de los tratamientos con extractos vegetales, comparados con los tratamientos con antibióticos. Estos resultados brindan perspectivas de estudio encaminadas a la búsqueda de nuevas alternativas de terapia antimicrobiana relacionadas con enfermedades periodontales.

Palabras claves: *Porphyromonas gingivalis*, *Cinnamomum verum*, microscopía de fuerza atómica.

Abstract

People has used various medicinal plants as an alternative or complement to the treatments for various conditions including periodontal disease. It was reported that plants such as *Castela texana* and *Cinnamomum verum*, containing compounds with antimicrobial activity. The term periodontitis is used to define inflammation of the tissues supporting the teeth, usually a progressively destructive change, with loss of bone and periodontal ligament by extension of inflammation from the gum. It is a bacterial disease that affects 5-20% of adults between 30 and 60, around the world. One of the bacteria involved in chronic and aggressive periodontitis, considered as the main causative agent is *Porphyromonas gingivalis*. This microorganism has virulence factors that provide great potential to colonize and invade periodontal tissues, modulate the host immune response, enabling the development of a chronic inflammatory response, and to collaborate with the processes of destruction of periodontal tissue and alveolar bone. The objective of this study was to determine the biological activity of the aqueous extract of *C. verum* in *P. gingivalis*. Furthermore, nanomechanical morphological characterization of the biological activity of the aqueous extract of *C. verum* by Atomic Force Microscopy (AFM) compared to antibiotics used in peri-

odontal treatment. The results indicate that the extract of *C. verum* showed higher biological activity in *P. gingivalis*. AFM allowed us to study, characterize and analyze the morphological and nanomechanical properties of *P. gingivalis* in presence of treatments and this we provided information that may be useful to better understand the interactions of treatments with plant extracts, when compared to treatment with antibiotics. These study results provide perspectives on the way to finding new alternative antimicrobial therapy related to periodontal diseases.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, *Cinnamomum verum*, Atomic Force Microscopy.

Introducción

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades que afectan a los tejidos (periodonto) que rodean y sujetan a los dientes en los maxilares. Son de naturaleza inflamatoria y de causa infecciosa, que dependiendo de su grado de afectación las denominamos gingivitis, cuando el proceso inflamatorio solamente afecta al periodonto superficial (la encía) y no están afectados los tejidos que sujetan el diente. Cuando el proceso inflamatorio afecta a los tejidos periodontales profundos, se produce destrucción del hueso y ligamento que soportan y sujetan los dientes, a este grado de afectación lo denominamos periodontitis (SEPA, 2004). Una de las bacterias implicadas en la periodontitis crónica y agresiva además de ser considerada como su principal agente etiológico es *P. gingivalis* (Slots, 1979; 2002). En los últimos años la resistencia a los antibióticos en la enfermedad periodontal se ha convertido en un problema clínico, epidemiológico y de salud pública. Cada vez hay menos antibióticos eficaces disponibles y más resistencias a los mismos (Pharma Editores, 2007). Hoy en día, tanto en medicina general como odontológica, se está investigando nuevas alternativas de tratamientos antibacterianos, dado el continuo aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales y por las reacciones adversas que estos producen en algunos pacientes (Rodríguez, 2010). Las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades (Carrillo, 2011).

El objetivo del trabajo es determinar la actividad biológica del extracto acuoso de *C. verum* sobre el crecimiento in vitro de *P. gingivalis* y caracterizar los cambios en las propiedades morfológicas y nanomecánicas de este microorganismo por MFA.

Materiales y Métodos

El extracto obtenido se sometió a las siguientes pruebas “Pruebas coloridas” o pruebas de identificación química, cada una de estas pruebas fue llevada a cabo en placas de porcelana con varios pozos, cada pozo fue utilizado para una prueba en específico (Domínguez, 1973).

Para la valoración de la actividad biológica por el método de espectrofotometría, se tomó un inóculo inicial de 100 μ L de *P. gingivalis* previamente activada y las concentraciones del extracto acuoso de *C. verum* a evaluar [1, 1, 7 y 10mg/mL], se mezclaron en tubos de 13x100 mm conteniendo un volumen de 5mL de medio de cultivo MPT caldo estéril, los tubos se llevaron a incubar a 37°C por 24h, posteriormente, se procedió a leer las absorbancias de los tubos a 635 nm en un espectrofotómetro marca GENESYS™, a continuación, se realizaron los cálculos correspondientes a los valores obtenidos y se graficaron estos resultados empleando el programa Microsoft Excel 2013.

Para el método de vertido en placa, de los datos obtenidos por el método de espectrofotometría, se procedió a seleccionar la concentración con mayor actividad biológica del extracto acuoso de *C. verum* sobre *P. gingivalis*. En tubos 13x150 mm conteniendo un volumen de 9 mL de solución salina fisiológica 0.85% estéril. Se agregó 1 mL del extracto acuoso de *C. verum* y *P. gingivalis*, realizando diluciones seriadas 10-1 hasta 10-12, enseguida se realizó la técnica de vertido en placa, agregando 1mL de las diluciones 10-8 a 10-12 en placa de Petri por triplicado de cada uno de los tratamientos, posteriormente en condiciones de esterilidad, a las placas de Petri se vertieron 15 mL de agar MPT, homogenizando la muestra, dejando solidifi-

car el agar a temperatura ambiente, ya solidificado el agar, las placas de Petri se llevaron a incubar a 37°C por 24 h, después de este tiempo, se determinó la actividad biológica de los tratamientos por el método de recuento en placa, realizando los cálculos correspondientes al número de colonias obtenidas y graficando estos resultados empleando el programa Microsoft Excel 2013.

Por último, para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental estadístico en donde los datos de cuantificación se sometieron a un análisis de varianza con una $P < 0.05$ empleando la Prueba de Dunnett-T (2-side) con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 2007, para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos utilizados.

Resultados

En el extracto acuoso de *C. verum* se observó la presencia de la mayoría de los grupos fitoquímicos examinados: grupo carbonilo, esteroides y triterpenos, carbohidratos, flavonoides del tipo quinonas, alcaloides, saponinas y aromaticidad, con ausencia de los compuestos de tipo: insaturaciones, oxhidrilos fenólicos y sesquiterpenlactonas. Se comprobó la existencia de una gran diversidad de grupos fitoquímicos presentes en el extracto acuoso de *C. verum*, lo que fundamenta su empleo para determinar la actividad biológica de estos tratamientos sobre el crecimiento in vitro de *P. gingivalis*.

Para valorar la actividad tóxica del extracto acuoso de *C. verum*, este fue evaluado sobre nauplios de *A. salina*. Con los resultados obtenidos se calculó la dosis letal media del extracto alcanzado una DL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ con un valor de 4066.11 $\mu\text{g/mL}$.

Se realizó la valoración de la actividad biológica del extracto acuoso de *C. verum* sobre crecimiento in vitro de *P. gingivalis* por método de espectrofotometría y método de recuento en placa. Para el método de recuento en placa, se empleó un control positivo de viabilidad celular, con un inóculo inicial de 1 mL y el control negativos de crecimiento: la tetraciclina a la

misma concentración. Los resultados obtenidos para el control positivo muestran un valor promedio de rendimiento celular de 610 UFC/mL, comparado este valor con los resultados obtenidos por el tratamiento nos indica una alta sensibilidad de la cepa de *P. gingivalis* al extracto acuoso de *C. verum* ya que se obtuvieron 45.78 UFC/mL y en presencia de la tetraciclina se obtuvo 159 UFC/mL (Figura 1). Para el método de espectrofotometría, los resultados obtenidos muestran una alta sensibilidad de la cepa de *P. gingivalis* al tratamiento que fue evaluada, obteniendo un valor promedio de absorbancia para el control positivo de 1.6648 nm, para tetraciclina fue de 0.07025 nm y el extracto acuoso de *C. verum* mostró una absorbancia de 0.6798 nm. Los resultados obtenidos en este bioensayo son el resultado de 3 eventos independientes por triplicado, graficados como medias, con el programa Microsoft Excel 2018.

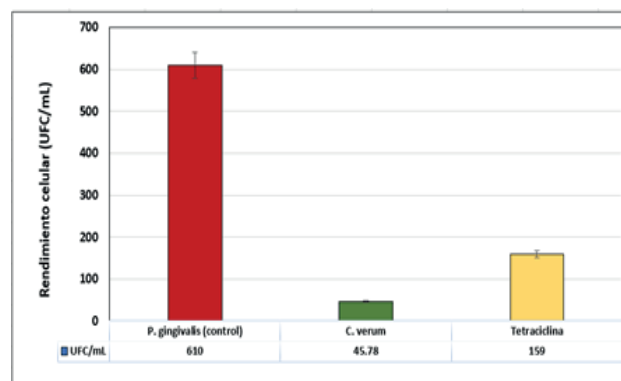


Figura 1. Determinación de la actividad biológica del extracto acuoso de *C. verum* [7mg/mL] sobre *P. gingivalis* por el método de recuento en placa.

Se estudiaron los cambios morfológicos de *P. gingivalis* en presencia del extracto acuoso de *C. verum* y de la tetraciclina a 7mg/mL. Las muestras de *P. gingivalis* se caracterizaron con un Microscopio de Fuerza Atómica marca NT-MDT modelo NTEGRA PRIMA, operado en el modo de contacto, midiendo y cuantificando la morfología de las bacterias. El análisis realizado proporcionó los siguientes datos: altura, ancho, largo, volumen, rugosidad y elasticidad de las muestras control de *P. gingivalis* (ausencia de tratamiento), así como en presencia del extracto acuoso de *C. verum* y del antibiótico tetraciclina empleando el software NOVA 1.0.1921.(Figura 2)

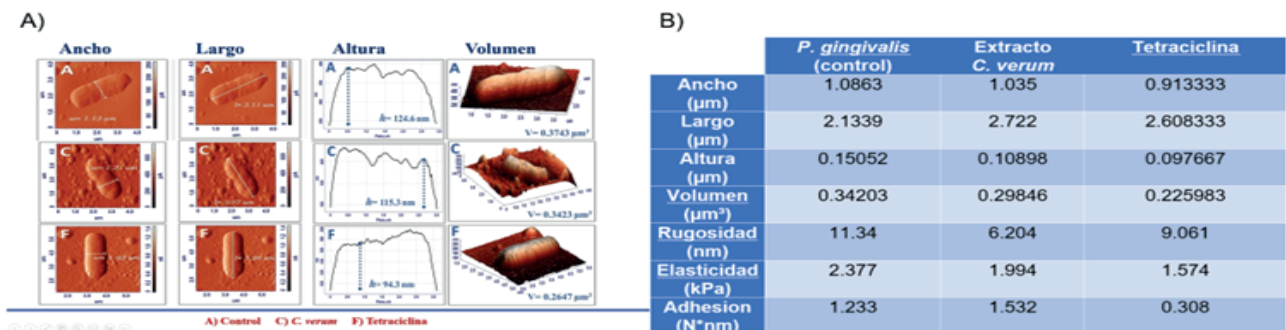


Figura 2. A) Caracterización y análisis morfológico de *P. gingivalis* por AFM en presencia de extracto acuoso de *C. verum*, y tetraciclina. Imágenes de altura, largo, perfil de altura y volumen. B) Tabla de valores del análisis de propiedades morfológicas y nanomecánicas.

Discusión

En los ensayos biológicos realizados, se observa una sensibilidad de la cepa de *P. gingivalis* al tratamiento de *C. verum* a las concentraciones de 0.1, 7 y 10 mg/mL, siendo la concentración de 7 mg/mL, la que presentó mayor actividad biológica, con una inhibición de 92%. Esto indica una similitud con lo reportado por Méndez (2011), ya que el autor reporta que el extracto acuoso de *C. verum* presenta actividad antibacteriana sobre bacterias relacionadas a periodontitis, llegando a inhibir casi el 100% de las bacterias estudiadas. En otro trabajo reportan que el extracto de *C. verum* (canela) mostró un amplio espectro de acción, sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Herrera y García, 2006).

Lo anterior indica que los metabolitos secundarios de *C. verum* son agentes antibacterianos de amplio espectro, activos contra una amplia gama de bacterias patógenas.

Los valores obtenidos a partir de la caracterización de propiedades morfológicas y mecánicas indican que las células de *P. gingivalis* disminuyen el ancho, aumentan el largo, disminuyen la altura, disminuyen el volumen y pierden rugosidad en su estructura celular cuando se encuentran en presencia del tratamiento con el extracto.

Por consiguiente, los metabolitos secundarios del extracto *C. verum* inducen cambios morfológicos significativos con respecto a las bacterias control, observándose una pérdida de la morfología coco-bacilar característica, un deterioro y una afectación en la integridad de la pared celular y en la estructura interna de las bacterias analizadas.

Conclusiones

La evaluación de *P. gingivalis* por el método de Recuento Bacteriano en Placa muestra sensibilidad al antibiótico tetraciclina y una alta sensibilidad al extracto acuoso de *C. verum* a una concentración de [7mg/mL]. Este estudio describe por primera vez la aplicación de un Microscopio de Fuerza Atómica para caracterizar los cambios en las propiedades morfológicas y nanomecánicas de *P. gingivalis*.

Referencias bibliográficas

- Carrillo, M. N. (2011). Aloe vera: Agente Antimicrobiano. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. Documento electrónico. Recuperado de <https://docplayer.es/28109553-Instituto-tecnologico-superior-del-sur-del-estado-de-yucatan-taller-de-investigacion-ii-aloe-vera-agente-antimicrobiano.html>
- Domínguez, X. A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. 1a edición. Editorial Limusa Editoriales: México. pp. 584.
- Herrera, F. C. y García, R. O. (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 4(2), 13–19. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90340202>
- Méndez, C. (2011). Actividad biológica de extractos de *Illicium verum* y *Cinnamomum verum* sobre bacterias relacionadas a periodontitis, Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Pharma Editores S.L. (2007). Antibacterianos, de Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Recuperado de <http://www.imedicinas.com/GPTage/Obrir.php?ident=ca05se01>

Rodríguez, M. R. (2010). Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2216>

SEPA (2004). Las Enfermedades Periodontales, de Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración. Recuperado en <http://www.dentalqb.com/paginas/enfperio.htm>

Slots, J. (1979). Subgingival microflora and periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 6(5), 351–382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1979.tb01935.x>

Slots, J. (2002). The search for effective, safe and affordable periodontal therapy. *Periodontology* 2000, 28, 9–11. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280101.x>