

ENFERMEDAD PERIODONTAL: ACTIVIDAD DE *Rosmarinus officinalis* SOBRE SU MICROBIOTA BACTERIANA

Claudia Araceli Reyes Estrada¹, Rosalinda Gutiérrez Hernández², José Pablo Luna de la Torre³, Josseline Alejandra Romero Dávalos⁴, Blanca Patricia Lazalde-Ramos⁵, Rubén Octavio Méndez Márquez⁶.

Resumen— Las enfermedades gingivales y periodontales se consideran la segunda causa asociada a pérdida dental, siendo los microorganismos presentes los responsables del comienzo y desarrollo de la enfermedad. Ante las inmensas propiedades terapéuticas del *Rosmarinus officinalis*, nuestro objetivo fue determinar su actividad antimicrobiana sobre bacterias presentes en enfermedad periodontal. Obtenidas las muestras de pacientes se cultivaron en agares MAS, EMB, SIM, MH y AS, se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación y aislamiento y se evaluó el efecto antibacteriano por técnicas tradicionales de susceptibilidad y proliferación celular mediante ensayo MMT. Se identificaron *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) y *Tannerella forsythensis* (Tf). Se observó la ausencia de efecto antibacteriano contundente. Concluimos que en la enfermedad periodontal *Rosmarinus officinalis*, bajo las condiciones evaluadas, no presentó efecto antibacteriano.

Palabras clave—*Rosmarinus officinalis*, enfermedad periodontal, periodontitis, antibacteriano

Introducción

Las enfermedades gingivales y periodontales presentan una alta incidencia a nivel mundial: se estima que la gingivitis afecta cerca del 80% de los niños en edad escolar y más del 70% de la población adulta ha padecido gingivitis, periodontitis o ambas. Además es considerada como la segunda causa asociada a la pérdida dental (Villarreal, 2014). Este padecimiento se caracteriza por ser una enfermedad infecciosa, indolora y lentamente progresiva, siendo uno de los agentes etiológicos principales los microorganismos como bacterias, hongos y virus, que contribuyen junto a la mala higiene, edad, estilo de vida y lesiones bucales previas a la aparición de esta enfermedad (Liebana, Castillo y Álvarez, 2004; Bascones, 2005).

La elevada prevalencia de la enfermedad periodontal fundamenta la constante búsqueda de agentes antimicrobianos viables que puedan incidir para abatir esta infección. Se buscan, como alternativa, los extractos de plantas naturales que han sido utilizadas en medicina tradicional ya que algunos tratamientos son demasiado costosos de acuerdo a la población a la cual va dirigida, siendo principalmente comunidades y zonas rurales (Azad, Schwirtz y Jentsch, 2016). El objetivo planteado fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *Rosmarinus officinalis* en bacterias presentes en enfermedad periodontal, cuya finalidad es proporcionar avances para el posterior empleo de dicho extracto como una alternativa efectiva contra este tipo de infecciones.

El *Rosmarinus officinalis*, también llamado romero, es una planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos del cuerpo humano. Al tener un alto contenido en aceites esenciales, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético, emenagogo y antigonadotrópico (Ghasemian, Owlin y Owlia, 2016). Se sospechaba que las propiedades curativas del romero podrían efectos positivos en el tratamiento de las enfermedades gingivales y periodontales.

¹ Dra. en C. Claudia Araceli Reyes Estrada es Docente-Investigador del Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular de la Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas (autor correspondiente) c_reyes13@yahoo.com.mx

² Dra. en C. Rosalinda Gutiérrez Hernández es Docente-Investigador del Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular de la Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas rosalindagh@hotmail.com

³ José Pablo Luna de la Torre tesista de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas hioga_11@hotmail.com

⁴ Josseline Alejandra Romero Dávalos tesista de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas jossro09@gmail.com

⁵ Dra. en C. Blanca Patricia Lazalde Ramos es Docente- Investigadora de la Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma de Zacatecas. blancalazalde@gmail.com

⁶ M. en C. Rubén Octavio Méndez Márquez es Docente-Investigador y Responsable del Laboratorio de Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma de Zacatecas pacal2@hotmail.com

Materiales y Métodos

Obtención y tratamiento de la muestra

Con la colaboración de odontólogos calificados, se realizó la toma de muestra de pacientes con patología de periodontitis previa explicación informativa del proyecto y firma de consentimiento informado. Una vez obtenida la muestra del área afectada con puntilla de papel estéril, ésta fue introducida en el medio de transporte Stuart y Tioglicolato. En el laboratorio se inoculó la muestra en diferentes tipos de medios de cultivo: Mueller Hinton (medio de proliferación), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB por sus siglas en inglés, utilizado para la selección de bacilos Gram negativos), Agar de Sal y Manitol (utilizado para la selección bacterias Gram positivas) y Agar Sangre (utilizado para visualizar los tipos de hemólisis y bacterias anaerobias). Se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas. Enseguida se realizó la tinción Gram a cada una de las colonias representativas desarrolladas en las cajas inoculadas en las cuales hubo crecimiento, después de tener la identificación micro y macroscópica se realizaron las pruebas bioquímicas y de susceptibilidad correspondientes a cada uno.

Obtención del extracto de *Rosmarinus officinalis*

El romero (*Rosmarinus officinalis*, tipificado por el M. en C. Jesús Balleza Cadengo, de la Universidad Autónoma de Zacatecas de acuerdo a los criterios taxonómicos convencionales), se obtuvo de Plantas Medicinales de América SA de CV de la ciudad de México. Las hojas de *Rosmarinus officinalis* se secaron a la sombra, a temperatura ambiente. Posteriormente se obtuvo el extracto orgánico total utilizando la técnica descrita por Wu *et al.*, 1982. Las hojas secas se pulverizaron. Después, por maceración con metanol, se realizó una extracción en sistema de reflujo, se filtró por vacío y lo filtrado se blanqueó con carbón activado. El extracto de metanol se concentró a un volumen mínimo (90% menor) por medio de destilación en un Rotavapor Yamato (Rotary evaporator RE-51). Al residuo se le adicionó agua destilada y dio como resultado el extracto de Romero.

Manejo de los Extractos

Obtenido el extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* se prepararon diferentes diluciones para las pruebas de susceptibilidad tradicional a razón de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/mL como concentraciones origen y enseguida se realizaron diluciones de 100, 200 y 300 mg/mL, disolviéndose en alcohol metílico.

Pruebas Bioquímicas

Se realizaron las pruebas que se muestran en la tabla 1

Tabla 1.- Pruebas bioquímicas.

BACILOS	COCOS
Motilidad	Alfa-hemólisis
Crecimiento en medios habituales (AN)	Beta-hemólisis
Crecimiento a 45°C	Crecimiento anaerobio
Crecimiento a 65°C	Crecimiento en el aire y 5% de CO ₂
Crecimiento a pH 5,7	Crecimiento aerobio
Crecimiento en 7% de medio NaCl	Crecimiento a 10°C
Crecimiento anaerobio	Crecimiento a 45°C
Hidrolisis de Gelatina	Crecimiento con NaCl al 6.5%
Catalasa	Voges-Proskauer
Oxidasa	Producción de ácido:
Ureasa	1. Glucosa
Lisina descarboxilasa (ODC)	2. Sacarosa
Producción de Indol	3. Lactosa
Utilización de Citrato	4. Manitol
Reducción de nitrato	
Voges-Proskauer	
Reducción de ácido con:	
1. D-glucosa	
2. Lactosa	
3. Manitol	
4. Sacarosa	
Hidrolisis de almidón	

Pruebas de Susceptibilidad

Se realizaron tres pruebas para evaluar la susceptibilidad de los cultivos.

Vaciado en placa y extendido. Se tomó una asada de la muestra y se inoculó por agitación un tubo con 3 mililitros de Caldo Nutritivo (CN). Se incubó por 24 horas. Transcurrido el tiempo en un tubo con 3 mililitros de Caldo Nutritivo, se colocaron gotas del CN ya inoculado, hasta llevarlo al 0.5 de concentración en escala McFarland. A partir de la última dilución, se tomó una muestra con un hisopo estéril y se inoculó por extendido en una placa con agar Mueller Hinton y de esta misma muestra se toma 1 mililitro para vaciarlo en una placa donde después, se vaciaron también 12 mililitros de agar Mueller Hinton. Esto se repitió con cada una de las muestras y al final se colocaron sensibilizadores previamente impregnados de las concentraciones de extracto ya realizadas. Se incubaron por 24 horas y se observó cada caja para determinar la presencia de halos de inhibición.

Escala Nefelométrica McFarland. Los patrones de McFarland se utilizaron como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. El patrón 0.5 de McFarland se utilizó como una aplicación especial en la preparación de los inóculos bacterianos para la realización de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas. La realización de pruebas de sensibilidad requirió el uso de inóculos estándar en dilución de agar estandarizado, difusión en disco y pruebas de sensibilidad de microorganismos aerobios y anaerobios. Las normas de turbidez se prepararon mezclando productos químicos que generan precipitaciones para formar una solución acuosa de cloruro de bario que produce la formación de un precipitado. El patrón de 0.5 de McFarland corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de *Escherichia coli* de 1.5×10^8 células por ml³.

MTT (Kit de Ensayo de Proliferación Celular). Se inocularon tubos que contenían caldo nutritivo para tener una muestra concentrada y se incubaron durante 24 hrs para la proliferación. Después se colocaron 10 µl de este y se le añadieron las diferentes concentraciones del extracto a evaluar (2, 5, 10, 15, 20 y 25 µg) en 1 ml de caldo nutritivo. Se mantuvieron en reposo 10 a 15 min, se mezclaron y se tomaron 100 µl para colocarlos en los pocillos, después se incubaron en ambiente de CO₂ al 3% a 37±1°C por 24 horas. Posteriormente, se agregaron 100 µl de reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio) y se incubó durante 3 horas. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de solución cristalina para interpretar en lector de microplacas ELISA, a una longitud de onda de 570nm.

Resultados

Las pruebas bioquímicas para Bacilos Gram negativos indicaron que las bacterias analizadas son compatibles en resultados con *Enterococcus hermanniensis*, *Aerococcus chistensenii*, *Facklamia languida*, *Facklamia miroungae*. Las pruebas bioquímicas para *Streptococcus* Gram positivos indicaron que las bacterias analizadas son compatibles en resultados con *Paenibacilos wynn*, *Paenibacilos macerans*, *Paenibacilos assamensis*, *Paenibacilos koreensis* (estos resultados fueron obtenidos por medio de la base de datos ABIS online [http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html], la cual es una herramienta de laboratorio que utiliza un algoritmo de identificación basado en los resultados reportados de las tablas de identificación de los principales reportes especializados al respecto).

Una vez concluida la evaluación de las muestras se realizaron las pruebas de susceptibilidad a las diferentes concentraciones de extracto, observando que para ningún caso se presentó halo de inhibición del extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero), como se puede observar en la figura 1.

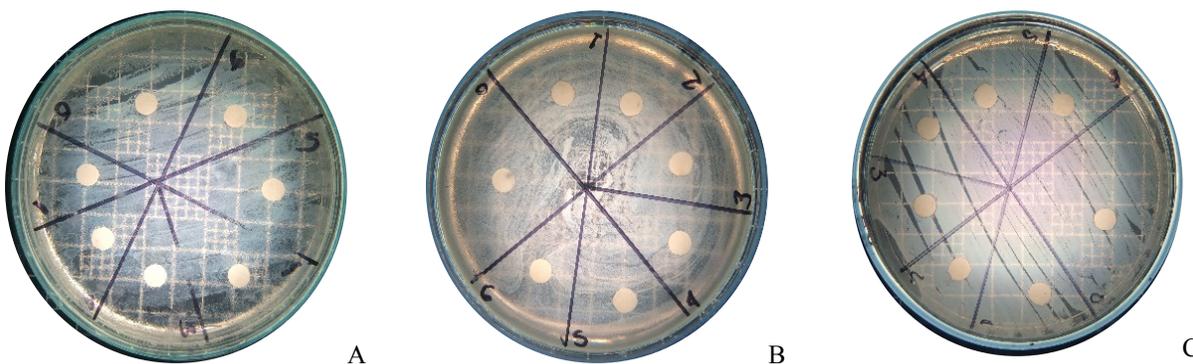


Figura 1. Prueba de susceptibilidad en placa, probada a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/mL. Donde A: Stuart Extendido en Placa; B: Stuart vaciado en placa; C: Tioglicolato.

Los resultados obtenidos con Romero fueron graficados. Los puntos muestran una variación más elocuente en cuanto se avanza en el nivel de concentración de extracto, aunque también es difícil considerar que los resultados sean positivos, y así corroborar el poder inhibitorio de esta planta.

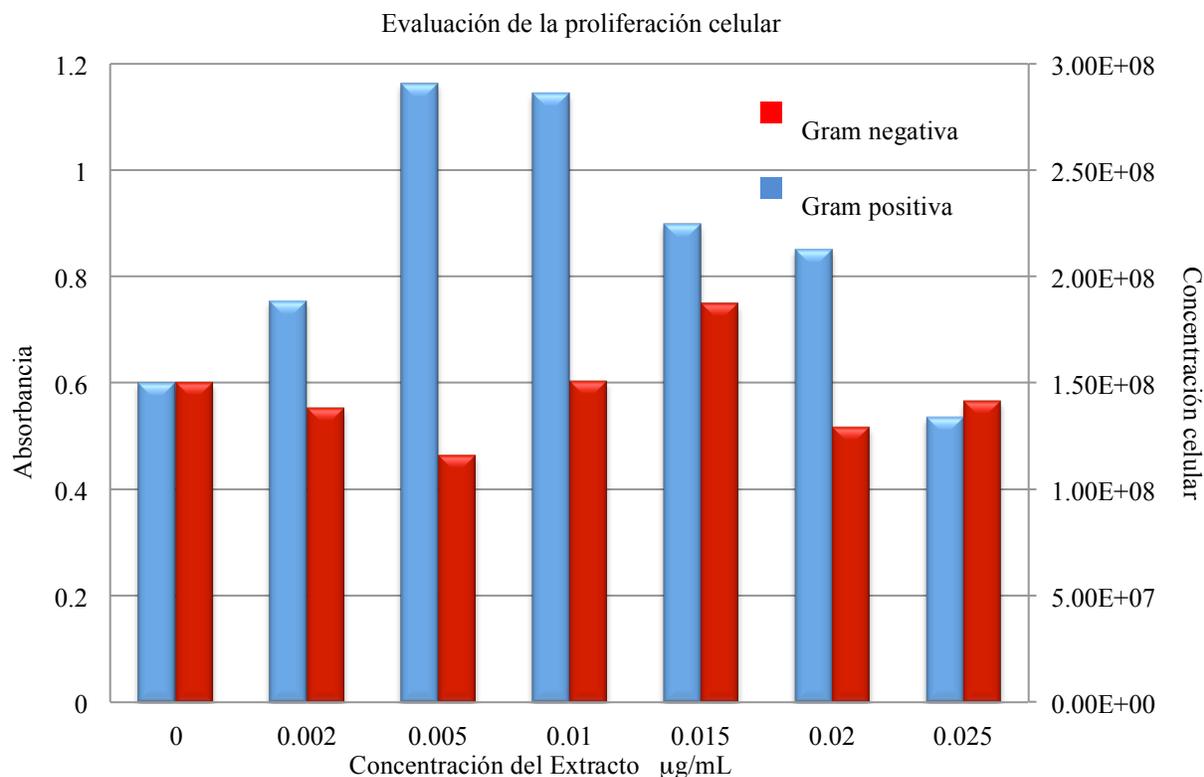


Figura 2. Prueba de evaluación de la proliferación celular ante concentraciones ascendentes del extracto de *Rosmarinus officinalis* mediante ensayo MTT. Se puede observar un comportamiento semejante independiente a la cantidad de células viables conforme aumenta la cantidad de extracto, terminando con una disminución casi total en la concentración de 0.025 µg/ml.

Además se realizó el antibiograma para las muestras bacterias Gram negativas y Gram positivas como se puede observar en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Antibiograma para bacterias Gram negativas.

Fármacos a los que hay resistencia: si o no		Imagen	Fármacos a los que hay resistencia: si o no		Imagen
Amicaciba AK:	no		Amicaciba AK:	si	
Ampicilina AM :	si		Ampicilina AM :	no	
Carbenicilina CB:	si		Carbenicilina CB:	si	
Cefaloitna CF:	si		Cefaloitna CF:	no	
Cefotaxima CTX:	si		Cefotaxima CTX:	no	
Cestriaxona CRO:	no		Cestriaxona CRO:	si	
Cloranfenicol CL :	no		Cloranfenicol CL :	no	
Gentamicina GE:	no		Gentamicina GE:	si	
Metilmicina NET:	no		Metilmicina NET:	no	
Nitrocurantoina NF:	no		Nitrocurantoina NF:	no	
Tefloxacino TEF:	no		Tefloxacino TEF:	no	
Trimetoprim con Sulfametoxazol SXT:	no		Trimetoprim con Sulfametoxazol SXT:	si	

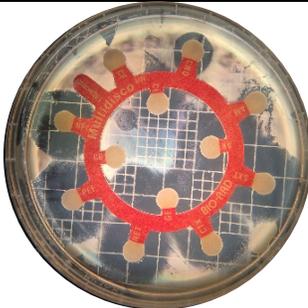
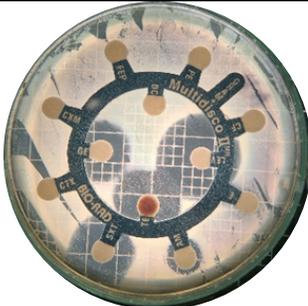
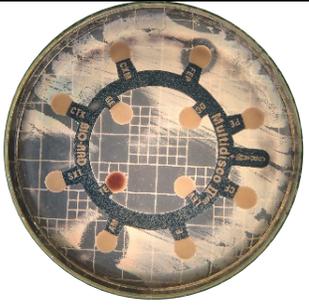
Amicaciba AK:	no		Amicaciba AK:	no	
Ampicilina AM :	si		Ampicilina AM:	si	
Carbenicilina CB:	si		Carbenicilina CB:	si	
Cefaloitna CF:	si		Cefaloitna CF:	si	
Cefotoxima CTX:	si		Cefotoxima CTX:	no	
Cestriaxona CRO:	no		Cestriaxona CRO:	no	
Cloranfenicol CL:	no		Cloranfenicol CL:	no	
Gentamiciona GE:	no		Gentamiciona GE:	no	
Metilmicina NET:	no		Metilmicina NET:	no	
Nitrocurantoina NF:	si		Nitrocurantoina NF:	no	
Tefloxacino TEF:	no		Tefloxacino TEF:	no	
Trimetropim con Sulfametoxazol SXT:	no		Trimetropim con Sulfametoxazol SXT:	no	

Tabla 3. Antibiograma para bacterias Gram positivas.

Fármacos a los que hay resistencia: si o no		Imagen	Fármacos a los que hay resistencia: si o no		Imagen
Ampicilina AM:	no		Ampicilina AM:	si	
Cefalotina CF:	si		Cefalotina CF:	si	
Cefotaxima CTX:	si		Cefotaxima CTX:	no	
Ceftazidima CAZ:	no		Ceftazidima CAZ:	no	
Cefaroxima CMX:	si		Cefaroxima CMX:	si	
Dicloxacilina DC:	si		Dicloxacilina DC:	si	
Extromicina E:	no		Extromicina E:	si	
Gentamicina GE:	no		Gentamicina GE:	no	
Pefloxacina PEF:	si		Pefloxacina PEF:	si	
Penicilina PE:	si		Penicilina PE:	si	
Tetramicina TE:	si		Tetramicina TE:	si	
Trimetropim con sulfametaxol SXT:	no		Trimetropim con sulfametaxol SXT:	si	
Ampicilina AM:	no				
Cefalotina CF:	si				
Cefotaxima CTX:	si				
Ceftazidima CAZ:	no				
Cefaroxima CMX:	no				
Dicloxacilina DC:	si				
Extromicina E:	si				
Gentamicina GE:	no				
Pefloxacina PEF:	no				
Penicilina PE:	si				
Tetramicina TE:	no				
Trimetropim con sulfametaxol SXT:	no				

Consideraciones

Autores como Mehrazarin *et al.* (2017) y Azad *et al.* (2016) mencionan que las bacterias anaerobias Gram negativas prevalentes en la capa sublingual ayudan a la aparición de la enfermedad periodontal, algunas de ellas son *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) y *Tannerella forsythensis* (Tf).

Analizando las pruebas bioquímicas de los dos pacientes se encontraron las siguientes bacterias: *Paenibacilos wynnii*, *Paenibacilos macerans*, *Paenibacilos assamensis*, *Paenibacilos koreensis*, *Enterococos hermanniensis*, *Aerococos chistensenii*, *Facklamia languida*, *Facklamia miroungae*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus rupicaprae*, *Streptococcus vestibularis*, *Bacillus niacini*, *Bacillus psychrosacohardycticas*, *Lysinbacillus facisiformis*, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus aminovorans* y *Bacillus cirroflagelosas*.

La diferencia de bacterias y la no coincidencia con la literatura se puede atribuir a que en cada región del país se tiene diferencias en la forma de alimentación, el estrés al que se somete cada persona, los hábitos de asepsia y los síntomas de la enfermedad. La región anatómica de la cavidad bucal también predispone a que varíe cada etapa de la enfermedad, lo que concuerda con lo reportado por Azad *et al.* (2016).

El tratamiento con *Rosmarinus officinalis* no fue eficaz en el tratamiento de enfermedad periodontal avanzada, ya que en este tipo de enfermedades las bacterias son más propensas a generar resistencia. Por lo tanto, el extracto puede considerarse débil frente a tales bacterias y no confiable para poder considerarse un tratamiento alternativo o auxiliar de un tratamiento con antibióticos.

Es por ello que atribuimos a que el extracto acuoso que se utilizó en el proyecto no conservó adecuadamente los metabolitos presentes en la planta, que puede ser la causa de que los resultados sean discordantes a lo esperado, además del manejo de las muestras, ya que se aislaron bacterias que se encontraban en pacientes que posiblemente tenían alguna resistencia al metabolito presente.

Conclusiones y Trabajos Futuros

Se logró el correcto aislamiento e identificación de las bacterias *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) y *Tannerella forsythensis* (Tf), microorganismos presentes en diversos estadios y evoluciones de la enfermedad periodontal.

Aunque la investigación no fue tan exitosa como se esperaba, se concluye que sí ha rendido frutos relevantes. Con los avances obtenidos, se pretende conocer más a fondo los principios activos con efecto antibacteriano. Realizando una investigación más a fondo de lo que son las causas etiológicas de la periodontitis, y el aislamiento puro de las cepas bacterianas, se podría mejorar el estudio realizado, ya que quedaron incertidumbres en cuanto al aislamiento de cepas de las muestras obtenidas.

Con la utilización de instrumentos y equipos más especializados para medir el grado de inhibición que tienen los extractos de romero, sería posible tener una mejor perspectiva del alcance antibacteriano. Es importante un mayor conocimiento sobre los metabolitos que se encuentran en las diversas partes de las plantas utilizadas, ya que se utiliza cierta parte de estos. Conocer el historial clínico detalles sobre los efectos de este extracto, podría ser un factor contribuyente en el avance del tratamiento de futuras patologías de los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras para la presente investigación, ya que es importante saber qué grado de periodontitis presentan y si estos han estado bajo tratamientos posteriores a la enfermedad y así puedan incidir en los resultados.

Referencias

Azad, M. F., Schwartz, A., & Jentsch, H. F. Adjunctive use of essential oils following scaling and root planing—a randomized clinical trial. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 1. 2016.

Azad, M. F., Schwartz, A., & Jentsch, H. F. Adjunctive use of essential oils following scaling and root planing—a randomized clinical trial. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 1. 2016.

Bascones Martínez A, F. R. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. AvPeriodontolimplantol, 147-156. 2005.

Ghasemian, M., Owlia, S., & Owlia, M. B. Review of anti-inflammatory herbal medicines. Advances in pharmacological sciences, 2016.

Liebana, J., Castillo, A. M., y Álvarez, M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 75-91. 2004.

Mehrazarin, S., Alshaikh, A., & Kang, M. K. Molecular Mechanisms of Apical Periodontitis: Emerging Role of Epigenetic Regulators. Dental Clinics of North America, 61(1), 17-35. 2017.

Villareal, M. Potencial Antibacterial, Actividad Citotóxica y Mutagénica de *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y *Leucophyllum frutescens*. San Nicolas de los Garzas, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 2014.

Wu, J. W., Lee, M. H., Ho, C-T., Chang, S. S. Elucidation of the chemical structure of natural antioxidants isolated from rosemary. J. Am. Oil Chem. Soc. 59: 339-345. 1982.

Notas Biográficas

El **QFB José Pablo Luna de la Torre** es egresado de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

La **QFB Josseline Alejandra Romero Dávalos** es egresada de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

El **M. en C. Rubén Octavio Méndez Márquez** es Químico Farmacéutico Biólogo por la Universidad Autónoma de Zacatecas (mención honorífica, 2003), Maestro en Ciencias por la Universidad de Guanajuato (2005), y actualmente Responsable del Laboratorio de Microbiología del Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo y Docente Investigador de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

La **Dra. en C. Claudia Araceli Reyes Estrada** es Médica Cirujana por la Facultad de Medicina por la Universidad Juárez del Estado de Durango (2001), Internado Rotatorio y Servicio Social en Durango. Inicio de estudios de posgrado de Doctorado Directo en Agosto de 2004 en el Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular, de la Universidad Autónoma de Zacatecas, obteniendo el grado el 28 de Enero de 2011 con Mención Honorífica. También fue galardonada por el promedio más alto de su generación (2010), UAZ. Actualmente es Profesora en la Unidad Académica de Medicina Humana de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

La **Dra. en C. Rosalinda Gutiérrez Hernández** es Ingeniera Química por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas y Doctora en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular (julio del 2006) por esta misma institución.

Actualmente es Docente-Investigadora del Programa de Doctorado en Farmacología, de la Unidad Académica de Medicina Humana de la Universidad Autónoma de Zacatecas; Profesora PROMEP Perfil Preferente; Integrante del Cuerpo Académico en Consolidación.

La **Dra. en C. Blanca Patricia Lazalde Ramos** es Químico Farmacéutico Biólogo por la Universidad Juárez del Estado de Durango, con Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular por la Universidad Autónoma de Zacatecas, Docente-Investigador de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, de la UAZ.