

Efecto antimicrobiano in vitro de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales

Hilda Moromi Nakata¹, Elba Martínez Cadillo¹, Jorge Villavicencio Gastelú², Jonny Burga Sánchez¹, Donald Ramos Perfecto¹.

In vitro antimicrobial effect of *Camellia sinensis* on oral bacteria

¹ Departamento Académico de Ciencias Básicas

² Departamento Académico Médico Quirúrgico

^{1,2} Facultad Odontología. UNMSM

Resumen

Con el objeto de determinar, el efecto antimicrobiano in vitro de soluciones de *Camellia sinensis* (té verde) de cuatro marcas comerciales (A,B,C y D), se recolectó saliva no estimulada de 40 estudiantes universitarios y se sembró en el medio de Agar Tripticosa soya. Utilizándose el método de difusión por discos para las soluciones de té y los controles positivos (Amoxicilina) y negativo (agua destilada), las placas se incubaron a 37 °C /24 horas. Igual procedimiento se realizó con la Cepa de *S. mutans* ATCC 25175. De acuerdo a los resultados las cuatro marcas de té verde produjeron halos de inhibición de crecimiento de colonias. El análisis estadístico de las cuatro marcas de té determinó que existía diferencias significativas entre las medias de las muestras. Comparando pares de medias, resultó la existencia de diferencias significativas a nivel de 0.05 entre pares de marcas AB;AC;BD;CD. Por otro lado en el análisis de las muestras de infusión de té verde para determinar la presencia de polifenoles, mediante la espectrofotometría-infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), se observó picos de transmitancia en longitudes de onda para los grupos oxidrilos(-OH) y anillo aromático. De los resultados obtenidos se concluye que se ha evidenciado la acción antibacteriana para la cepa de *S. mutans*, así como para la microflora mixta salival, y que existe diferencias en la acción, dependiendo de la marca utilizada. Es necesario la continuación de los estudios para comprobar su efecto antimicrobiano in vivo, para el uso como enjuagatorio bucal, así como estudios para el análisis de los principales componentes activos del té verde para la identificación de las mejores soluciones a utilizar para dicho propósito, estudios de costo/beneficio, su aceptabilidad entre usuarios, efecto sobre otros microorganismos, etc.

Abstract

In order to determine, the antimicrobial effect in vitro of solutions of *Camellia sinensis* (green tea) of four commercial products (A, B, C and D), we collected not stimulated saliva of 40 university students and cultivated them in Trypticase soy Agar using Assay disc diffusion for the tea solutions, (Amoxicilina) as a positive control group and (distilled water) as a negative control group, plates were incubated to 37 °C/24 hours. The same procedure was performed for *S. mutans* ATCC 25175. According to results, all commercial products of green tea produced inhibition of zones of growth colonies. The statistical analysis of four commercial products of tea determined that significant differences between medias of the samples exists. Comparing couples of medias, it shows the existence of significant differences to level of 0.05 between couples of marks AB; AC; BD; CD. The analysis of samples of green tea infusion determined the presence of polyphenols, by spectrophotometry-infrared with transformed of Fourier (FT - IR), observed peaks of transmittance in wave lengths for the oxidriles groups (-OH) and aromatic ring. It is concluded that the antibacterial action has been demonstrated for the *S. mutans*, and for mixed salivary microflora, and there are differences in the action, depending on the product used. It is necessary to continue with studies to verify antimicrobial effect in vivo, to use as mouthrinse, as well as studies to analyze the principal active components of green tea to identify the best solutions to use for that purpose, studies of cost/ benefit, acceptability between users, effect on other microorganisms, etc.

Correspondencia:

Mg. Hilda Moromi Nakata

Facultad Odontología, UNMSM

Av. Amezaga s/n, Lima, 1 Perú.

Tlf: 6197000/3410

e-mail: hmoromin@unmsm.edu.pe

Palabras clave: Saliva, *Camellia sinensis*, *Streptococcus mutans*, polifenoles.

Key words: Saliva, *Camellia sinensis*, *Streptococcus mutans*, polyphenols.

Introducción

La caries dental es la enfermedad de mayor prevalencia de la cavidad bucal. El biofilm de la placa dental está íntimamente ligado a tal patología, siendo el *Streptococcus mutans*, el microorganismo más importante seguido por el *Lactobacillus* y el *Actinomyces*¹. De ahí que el control de los microorganismos relacionados con la placa dental, así como del proceso carioso, es de

vital importancia para el control de la enfermedad, y uno de los mecanismos es el uso de antimicrobianos.²

La medicina natural, a partir de las plantas y sus propiedades antimicrobianas, últimamente ha recibido mucha atención de los científicos, comprobando una serie de propiedades de compuestos como los polifenoles, que van confirmando que permiten combatir a los agentes patógenos

como el *Staphylococcus aureus* resistentes,^{3,4} y adicionalmente a otras bacterias bucales como *S. mutans*,^{5,6} y *Porphyromonas gingivalis*, referido por Okamoto;⁷ así como la actividad enzimática proteínica importante que afecta los tejidos periodontales.⁸

Las ventajas son diversas: fácil acceso, bajo costo y sobre todo pocos efectos colaterales indeseables. En el Té, especialmente el verde y el blanco,

la presencia de taninos que inhibe la síntesis del dextran⁹ el fluor que inhibe la acción enzimática, así como los flavonoides que inhibe la adherencia, la inhibición de la producción de ácido láctico¹⁰ por los extractos, entre otros, confieren efecto inhibitorio en el desarrollo del *S. mutans*, y también sobre los hongos, conocimientos que han propiciado la adición de los extractos en algunas pastas dentales.¹¹

En los últimos años se ha incrementado notoriamente los estudios de sustancias naturales, entre ellas el té, especialmente el verde hallándose una serie de propiedades antimicrobianas y anticancerígenas, entre otras. A tal punto que la Sociedad Americana de Microbiología, en su encuentro del 2004 con los investigadores de la Universidad de Pace de Nueva York, concluyen que los extractos de té verde matan las bacterias y que por tal característica ya puede ser incluido dentro de las alternativas para la higiene oral. Concepto que es concordante con las observaciones de otros investigadores como la doctora Wu, quien ha realizado valiosos estudios sobre esta materia.¹²

En concordancia con éstas consideraciones, el objeto de la investigación, fue determinar el efecto antimicrobiano in vitro, de soluciones de té verde sobre microorganismos de la flora salival y sobre cepas patrones ó estándares (American type culture ATCC) de *S. mutans*. Igualmente determinar la presencia de polifenoles.

Material y Métodos

Para la realización del estudio de tipo experimental, las muestras de saliva fueron colectadas de 40 estudiantes universitarios de entre 18-40 años de edad; 15 mujeres (37,5 %) y 25 hombres (62,5 %); de estos últimos uno fue eliminado por problemas en el procesamiento; de manera que se usó 39 muestras salivales.

Las muestras fueron colocadas en placas estériles a razón de alrededor 2 ml y procesadas dentro de los 60 minutos subsiguientes. Las muestras de saliva se sembraron mediante hisopo estéril, en placas de Agar Tripticosa soya (TSA). Luego mediante el método de difusión en discos de papel filtro, estos fueron embebidos en soluciones al 10 % de las soluciones problema de Té verde, y distribuidos de la siguiente manera: Disco A (The vert de Chine), Disco B (Organic nature's Cuppa Ceylon), Disco C (Te verde chino "C") y Disco D (Té verde chino verde "D"). Complementariamente se utilizó un

Cuadro 1. Determinación de Grupo - OH en muestras de té verde por el método de Espectroscopia Infrarrojo con transformada de Fourier.

Muestra comercial	Longitud de onda cm-1
A (The vert de Chine)	3351,07
B (Organic nature's Cuppa Ceylon)	3365,65
C (Te verde chino "C")	3326,10
D (Té verde chino "D")	3341,92

Cuadro 2. Determinación de Grupo aromático en muestras de té verde por el método de Espectroscopia Infrarrojo con transformada de Fourier.

Muestra comercial	Longitud de onda cm-1				
A	3351,07	1640,59	1147,82	1042,41	821,47
B	3361,65	1638,87	1147,96	1041,90	826,41
C	3326,10	1642,85	1148,36	1043,50	824,40
D	3341,92	1641,76	1148,77	1043,46	825,20

Disco E con Amoxicilina para actuar como control positivo, y otro Disco F con agua destilada estéril, como control negativo.

Los discos fueron colocados en las placas, por duplicado, e incubados a 37 °C por 24-48 horas, en aerobiosis. Para el análisis del efecto antimicrobiano de las soluciones de té frente a la cepa patrón de *S. mutans* ATCC 25175 (American Type Culture Collection) se resembró en los medios de cultivos de TSA y AMSB, y enfrentándose luego a las soluciones en las mismas concentraciones y modalidad citada en el párrafo anterior.

Para la determinación de la presencia de polifenoles en el Té verde, se utilizó el método de la Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), realizado en el servicio USAQ de la Facultad de Química é Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Resultados

Los resultados mostraron que los diámetros de los halos de inhibición variaron entre 6 a 20 mm, con valores medios de 8,07 a 10,43 mm. Las muestras de Té verde "D" presentan menor variación y por el contrario la muestra de Té verde A, tuvo mayor variabilidad. El análisis de varianza indicó que existe diferencias significativas entre las medias de la marcas AB, AC, BD y CD; las marcas A y D tuvieron similar efecto entre ellas, al igual que B y C. Todas las marcas utilizadas presentaron diferencias significativas frente al control positivo Amoxicilina (E) y

frente al control negativo (F).

El análisis para la determinación de

(Efecto antimicrobiano in vitro de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales figura 2)

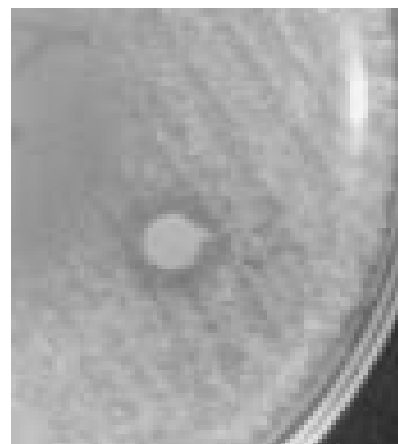


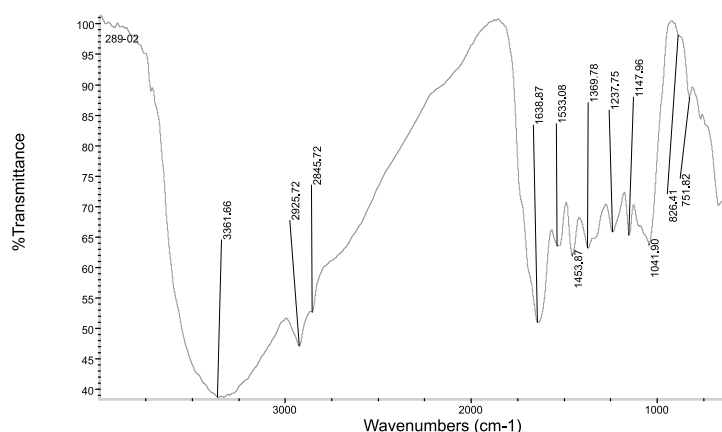
Fig2. Halo de inhibición antimicrobiana producida por el té de Organic Nature's Cuppa Ceylon

los polifenoles mediante el método de FT-IR, mostró picos de trasmittancia en longitudes de onda para los grupos oxidrilo (-OH) y anillo aromático (Cuadro 1). En el Cuadro 2 se muestra la determinación del Grupo aromático.

Discusión

Los efectos antimicrobianos para el control de microorganismos orales mediante sustancias naturales, se estudia desde décadas anteriores¹³ cobrando cada vez una mayor atención, especialmente en lo referente a la acción de los polifenoles (catequinas), presentes en productos como

Fig 3. Espectroscopía Infrarrojo con transformada de Fourier de la muestra de Organic Nature's Cuppa Ceylon



En la Fig 3 se registra la espectroscopía de muestra de Organic Nature's Cuppa Ceylon.

el té y sus variedades: verde, negro, etc; cuyas cuantías difieren por los particulares procesamientos antes del expendio al público.

Los resultados obtenidos en el estudio evidencian interesante comportamiento antimicrobiano del té verde. Este hallazgo es importante anotar, para confrontarlo con otros, como el de Lowry,¹⁴ quien mediante la Técnica de la Placa vertida, en una primera modalidad, usando la placa de agar con la saliva, a la cual se le colocó el disco embebido con Té; y en una segunda modalidad, usando la placa de agar mezclada con la solución de Té y a la cual se le colocó el baja lengua con la muestra salival; encontró resultados contradictorios. En la primera modalidad no halló inhibición, y en la segunda si observó inhibición; concluyendo que sus resultados son inconsistentes.

Por otro lado debe también agregarse, que los halos de inhibición observados en varios de los casos del estudio, no fueron completamente claros, pero evidenciaron una notoria disminución de microorganismos, es decir, hubo desarrollo de pequeñas colonias que persistían ante la solución, en los cultivos mixtos de las muestras salivales. Existen diversos mecanismos por los cuales el Té verde produce acción sobre las bacterias, entre ellas, la inhibición de la producción de ácidos y de la enzima glucosiltransferasa. Respecto a las concentraciones acuosas utilizadas, es otro aspecto a considerar para evaluar el efecto inhibitorio de la producción de polisacáridos. Se ha hallado que en concentraciones de 14,2 a 50 % v/v todos inhibieron el desarrollo bacteriano; mientras que en el caso de la producción de ácido láctico, la

menor concentración utilizada, 14,2%, no produjo inhibición.¹⁵

Por otro lado las diferencias que se observan en la mayor ó menor acción se relacionan con diferencias entre las concentraciones de los diversas catequinas: epiteliocatequina galate (EGCG), epicatequina galate (ECG), (epicatequina (EC) e epigalocatequina (EGC). Esto depende de la edad de las hojas, época de cosecha y método de procesamiento del producto, y hasta la puesta en el mercado, por ello es importante evaluar las diferentes marcas para establecer la potencialidad de los efectos benéficos de los productos que se ofertan a fin de dar una información adecuada a los usuarios.

Al término de la investigación se llega a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado la acción antimicrobiana in vitro de la infusión de cuatro marcas diferentes de té verde frente a los microorganismos salivales y a la cepa S, mutans ATCC 25175.
2. El comportamiento de las diferentes marcas de té verde varía, existiendo diferencias significativas comparándose entre sí, los promedios de halos de inhibición antimicrobiana.
3. Se ha determinado la presencia de polifenoles mediante el Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Agradecimiento

A la C.D Karim Diaz Ledesma, egresada de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y la Dra. Dora Maurtua Torres de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por la donación de la cepa de S mutans ATCC.

Referencias bibliográficas

1. Negroni M. Microbiología estomatológica. Argentina: Edit. Panamericana. 1999:223-225.
2. Negroni M. Microbiología estomatológica. Argentina: Edit. Panamericana. 1999:237.
3. Newson SWB. MRSA: Past, present, future. Journal of Royal Society of Medicine London. 2004;97:509.
4. Dryden MS, Dailly S, Crouch M. A randomised, controlled trial of tea tree tropical preparations versus a standard tropical regime for the clearance of MRSA colonization. J. Hosp Infect. 2004;54:283-6.
5. Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries Arch. Pharm Res 1998 Jun 21 (3):348-52.
6. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res (Switzerland) 1991;25(6):438-43.
7. Okamoto M, Leung KP, Ansai T, Sugimoto A, Maeda N. Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphatase in *Prevotella intermedia*. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:192-195.
8. Okamoto M, Sugimoto A, Leung KP, Kakayama K, Kamaguchi A, Maeda N. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:118-120.
9. S. Rosen M, Elvi-Lewis FM, Beck EX. Anticariogenic effects of tea in rats. J. Dent. Res. 1984;63(5):658-660.
10. Koopirojn K, Guay M, Peawchana W, Suesuwan A, Ingkasate. A Inhibition of lactic and polysaccharide formation of *Streptococcus mutans* by tea extract in Vitro. CU Dent J 2001;24:195-202.
11. Anónimo. Bacteriology; white tea has an inhibitory effect of various pathogenic bacteria. Obesity: Fitness & Wellness Weeks Atlanta. 2004;Aug 26: 86.
12. Didier PH. Green Tea Health Benefits. www.green-tea.dminternational.biz Mayo 2007.
13. Saeki Y, Ito Y, Shibata M, Sato Y, Okuda K, Takazoe I. Bull Tokio dent. Coll. 1989; 30(3):129-135.
14. Lowry E. A Study of the effects of green tea on oral Bacteria. California State Science Fair, 2004 Project summary. J1319.
15. Koopirojn K, Guay M, Peawchana W, Suesuwan A, Ingkasate. A Inhibition of lactic and polysaccharide formation of *Streptococcus mutans* by tea extract in Vitro. CU Dent J. 2001;24:195-202.

Recibido : 09-04-2007

Aceptado para publicación: 25-05-2007