

Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxyllum novogranatense*, *Plowman* var *truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica

Verónica Alvarado Villanueva¹, Hilda Moromi Nakata²

¹ Bachiller de la Facultad de Odontología de la UNMSM

² Profesora Principal del DA de C. Básicas UNMSM

Correspondencia:

CD Verónica Alvarado Villanueva

E-mail: veronicajanetav@gmail.com

Medicinal plants: Antibacterial effect *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxyllum novogranatense*, *Plowman* var *truxillense* and *Camellia sinensis* on stomatologic importance bacteria

Resumen

El objetivo de la investigación fue comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales: *Plantago major* L. (llantén), *Erythroxyllum novogranatense* var *truxillense* (coca trujillo) y *Camellia sinensis* (té verde) mediante el método de difusión en agar con discos, sobre cinco cepas patrones de bacterias orales: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus*. ATCC 314, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de principios activos totales procedentes de las hojas secas de cada una de las plantas, mediante maceración alcohólica con alcohol etílico al 70 % y posterior evaporación del solvente con el empleo del rotavapor. Cada extracto se diluyó en alcohol etílico al 70 % en las concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL. Estas soluciones fueron comparadas con PerioAid® (clorhexidina 0,012 %) como control positivo y con alcohol etílico al 70 %, como control negativo. Al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro*, se obtuvieron los siguientes resultados: los tres extractos hidroalcohólicos en ambas concentraciones presentaron actividad antibacteriana mayor al alcohol etílico (5,8 mm) y menor que el PerioAid® (22,0 mm) sobre las cinco cepas bacterianas en estudio. La mayor actividad presentó el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* a 50 µg/mL, la menor actividad presentó *Plantago major* a 25 µg/mL. Se concluye que los tres extractos hidroalcohólicos en las diluciones de 25 y 50 µg/mL presentaron actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*. El efecto antibacteriano aumentó con la concentración en *P. melaninogenica*, que fue la cepa más sensible y *A. viscosus* la menos sensible.

Palabras clave: Plantas medicinales, efecto antibacteriano, *Plantago major* L, *Erythroxyllum novogranatense* var *truxillense*, *Camellia sinensis*.

Abstract

The objective of this research was to compare the antibacterial activity *in vitro* of the hydroalcoholic extracts of three medicinal plants: *Plantago major* L. (plantago), *Erythroxyllum novogranatense* var *truxillense* (trujillo coca) and *Camellia sinensis* (green tea) by the agar disk diffusion method on five strains of oral bacteria: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus*. ATCC 314, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845 and *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. The hydroalcoholic extracts were obtained from total active principles from the dry leaves of each plant, by maceration in alcohol with ethyl alcohol at 70 % and subsequent evaporation of the solvent with the use of a rotary evaporator. Each extract was diluted in ethyl alcohol at 70% in concentrations of 25 µg/mL and 50 µg/mL. These solutions were compared with Perio Aid® (chlorhexidine 0.012%) as positive control and with ethyl alcohol at 70% as negative control. When performing the sensitivity tests *in vitro*, the following results were obtained: the three hydroalcoholic extracts in both concentrations showed a higher antibacterial activity than the ethyl alcohol (5.8 mm) and lower than the Perio Aid® (22.0 mm) on the five bacterial strains being studied. The highest activity showed the hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis* at 50 µg/mL, the lowest activity showed *Plantago major* L. at 25 µg/mL. It is concluded that the three hydroalcoholic extracts in the dissolutions of 25 and 50 µg/mL showed antibacterial activity on *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* and *Fusobacterium nucleatum*. The antibacterial effect was increased with the concentration on *P. melaninogenica*, which was the most sensitive strain, and *A. viscosus* was the less sensitive.

Key words: Medicinal plants, Antibacterial effect, *Plantago major* L, *Erythroxyllum novogranatense* var *truxillense*, *Camellia sinensis*.

Fecha de recepción: 24-06-10

Fecha de aprobación: 08-11-10

Introducción

En muchas ocasiones para curar determinadas patologías que afectan la salud se ha tenido que recurrir a ciertos procedimientos terapéuticos que se apartan de la medicina tradicional. En la actualidad, esta alternativa médica experimenta un auge cada vez más creciente, sin embargo estas no son absolutamente nuevas, sino que casi en su totalidad son los resultados de técnicas y procedimientos usados tradicionalmente.

El uso de las plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas. La investigación, en este sentido, brinda la oportunidad de encontrar nuevos principios activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una materia prima más económica y natural.

Para la presente investigación se seleccionaron a tres plantas medicinales usadas en medicina tradicional que se cultivan o crecen en el Perú debido a que existen numerosos antecedentes de sus propiedades antibacterianas sobre diversas bacterias patógenas, el objetivo fue el comparar la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de tres plantas medicinales: *Plantago major L.* (llantén), *Erythroxylum novogranatense (Rusby) Plowman var. truxillense* (coca Trujillo) y *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL sobre cinco bacterias patógenas orales de importancia estomatológica presentes en caries dental y enfermedad periodontal: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*; mediante el método de Difusión en Agar con el uso de discos. Estas bacterias se van a encontrar en la placa dental y aunque existen diversos métodos utilizados para el control de la placa ninguno ha demostrado ser totalmente eficaz. Cada vez está más extendido el denominado control químico de la placa de manera complementaria a un control mecánico ineficaz, para lo cual se utilizan antisépticos bucodentales; sin embargo existen efectos secundarios no deseados como la pigmentación. Por eso al demostrar la actividad antibacteriana de sustancias de origen natural se estarían planteando alternativas económicas y de mayor aceptación por la población peruana.

Metodología

1. Obtención de las plantas medicinales

Las hojas de las plantas provienen de diversas zonas del territorio peruano. Las hojas frescas de *Plantago major L.* se recolectaron en el valle de Carapongo a la altura del km 17 de la Carretera Central, Chosica, Lima, Perú; se lavaron y se pusieron a secar bajo sombra durante dos días; la hojas secas de *Erythroxylum novogranatense (Rusby) Plowman var. truxillense* se obtuvieron en el caserío de Huayobamba, Huaranchal, Provincia de Otuzco, La Libertad, Perú. Las hojas secas de *Camellia sinensis* fueron adquiridas en forma del producto comercial Te verde "Schagreen" (Alprosur), tipo granel por 100 g que contiene 100 % hojas de té verde, las cuales provienen del valle Yanayaco Chico s/n, Huayopata, La Convención, Cusco, Perú.

2. Obtención de principios activos totales

Para la obtención de los principios activos totales se empleó la técnica de maceración alcohólica.^{1,2,3,4} El procedimiento fue el siguiente: en un envase estéril de vidrio ámbar de 4 litros de capacidad se colocó en su interior ½ Kg. de hojas secadas en estufa por 24 h a 60°C, de la planta seleccionada previamente molida. Luego se añadió alcohol etílico rectificado de 70 % hasta que cubra por completo el contenido de las hojas molidas. Este frasco se agito tres veces por día; el tiempo de maceración fue por 7 días.

Después de los 7 días de maceración se filtro por una membrana estéril. Posteriormente se procedió a la evaporación del contenido alcohólico de lo filtrado con la ayuda del Buche Rotavapor V-805 a 270 mbar de presión, 40 °C de temperatura y a una rotación de 100

rpm, obteniéndose, de esta manera los principios activos totales.

3. Análisis Fitoquímico^{5,6}

El análisis fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de principios activos totales de las plantas medicinales, comprendió la identificación de los grupos funcionales que con más frecuencia se encuentran en estas plantas, mediante pruebas específicas y claras (Tabla 1).

4. Reactivación de las cepas estándares ATCC

Cada una de las cepas ATCC se mantuvo en condiciones de refrigeración normal (2-8 °C) hasta su reactivación bajo las condiciones de crecimiento que cada una de ellas requiere (Tabla 2).

Prueba para la determinación de la sensibilidad antibacteriana

Se tomaron las colonias con asas de siembra de cada una de las cepas reactivadas y se diluyeron en suero fisiológico hasta obtener la escala de turbidez de 0.5 de Mc Farland, $1,5 \times 10^8$ excepto para el caso de *Lactobacillus* que fue de $2, 6 \times 10^8$ UFC/ml, con el fin de poder apreciar mejor los halos de inhibición. Con micropipeta se extrajeron 100 µL de cada una de las suspensiones mencionadas y este contenido se depositó en las placas con agar. Con ayuda de un hisopo estéril, se realizó la siembra por diseminación. Fueron sembrados: *Streptococcus mutans* en agar TSA, *Lactobacillus acidophilus* en agar Rogosa y, en los casos de *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum* en Agar Shadler suplementado con sangre de cordero al 5 %

Con pinzas estériles se procedió a colocar en cada placa un disco de papel de filtro embebido en 10 µL de diglucuronato de clorhexidina al 0,12 % (control positivo), un disco de papel filtro

Tabla 1. Principios activos encontrados en los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales.

Prueba	Principio activo	Llantén	Té verde	Coca
Prueba de la espuma	Saponinas	E	+	E
Reacción de Shinoda	Flavonoides	+	-	-
Reacción de cloruro férrico	Fenoles	+	+	+
Reacción de Dragendorff	Alcaloides	-	E	+
Reacción de Mayer	Alcaloides	-	-	+
Reacción de Baljet	Lactosas	-	-	+
Reacción de Bortranger	Quinonas	+	+	-
Reacción de Hidroxamato férrico	Cumarinas	-	E	E

Intensidad de la respuesta, (+) Positivo, (E) Escaso, (-) Negativo

embebido en 10 ul de alcohol al 96 % (control negativo), un disco de papel de filtro embebido con 10 µL del extracto hidroalcohólico a la concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL de las siguientes plantas: *Plantago major* L., *Erythroxylum novogranatense* (Rusby) *Plowman var. Truxillense* y *Camellia sinensis*; a una distancia no menor de 15 mm entre ellos y a 1,5 cm del borde de la placa, presionándolos firmemente sobre la superficie del agar. Seguidamente se incubaron bajo las condiciones mencionadas en tabla 2, para proceder a la lectura de los resultados en términos de mm de diámetro de halos de inhibición. Todo el procedimiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Resultados

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de las actividades antibacterianas de los extractos hidroalcohólicos de las tres plantas medicinales en las diluciones 25 y 50 µg/mL, del Control positivo (Pe-

rioAid®) y del control negativo (alcohol etílico al 70 %), basados en los promedios de las de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano.

En general se aprecia que dicha actividad siempre fue mayor que la del control negativo y menor que la del control positivo, se observa también que de entre los grupos de estudio los resultados mayores los obtuvo el extracto hidroalcohólico de *C. sinensis* a 50 µg/mL sobre *S. mutans* (20 mm), mientras que la menor la presenta el extracto hidroalcohólico de *P. major* L a 25 µg/mL sobre *A. viscosus* (7,4 mm). Se aplicó la prueba estadística de Kruskal y Wallis comparando la actividad antibacteriana de los tres extractos a 25 µg/mL con los controles positivo y negativo por tipo de bacteria, el mismo procedimiento se realizó con los extractos a 50 µg/mL, obteniéndose como resultado de dicha prueba que existen diferencias estadísticamente significativas (valores $p < 0,05$) entre la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos y los controles por tipo de bacterias al 95 % de confianza. Posteriormente se aplicó la

prueba de Comparaciones Múltiples HSD de Tukey, comparando la actividad antibacteriana de cada extracto con cada control y los extractos entre ellos por tipo de bacteria y de esa manera se determino que solamente en la comparación de la actividad antibacteriana de *Camellia sinensis* a 50 µg/mL con el Control positivo sobre la bacteria *Prevotella melaninogenica* se obtuvo un valor $p = 0,127$, lo que indica que estadísticamente dichas sustancias presentan el mismo comportamiento.

En la Figura 1 se observan los halos de inhibición formados por la actividad de los extractos hidroalcohólicos de las tres plantas medicinales en ambas concentraciones, del control positivo y del control negativo sobre *Streptococcus mutans*.

En las Figuras 2, 3, 4 y 5 se observa dicha actividad pero sobre las bacterias *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces*

Tabla 2. Condiciones para la reactivación de cepas utilizadas para el estudio.

Tipo de microorganismo	Número ATCC	Temperatura incubación	Tiempo incubación	Condiciones de aerobiosis	Medio de cultivo
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	37 °C	48 h	Microanaerobiosis	Agar Tripticasa soya(TSA)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	314	37 °C	48 h	Anaerobiosis	A.Rogosa
<i>Actinomyces viscosus</i>	15987	37 °C	48 h	Anaerobiosis	A.Schaedler
<i>Prevotella melaninogenigenica</i>	25845	37 °C	7 días	Anaerobiosis	A.Schaedler
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25586	37 °C	7 días	Anaerobiosis	A.Schaedler

Tabla 3. Halos de inhibición promedio de extractos hidroalcohólicos frente a cinco cepas bacterianas.

Bacterias	Extractos hidroalcohólicos						Controles	
	<i>P. major</i>		<i>C. sinensis</i>		<i>E. novogranatense</i>		Control positivo	Control negativo
	25 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL		
<i>S. mutans</i>	7,6	8,8	15,4	20,0	8,8	10,4	22,0	5,0
<i>L. acidophilus</i>	9,0	9,2	10,6	11,6	9,8	10,0	13,2	5,4
<i>A. viscosus</i>	7,4	9,2	7,6	9,4	8,8	9,4	13,2	5,8
<i>P. melaninogenigenica</i>	10,4	11,2	13,6	15,2	12,6	13,4	17,0	5,8
<i>F. nucleatum</i>	9,0	11,0	9,6	10,6	9,6	11,0	15,4	5,8

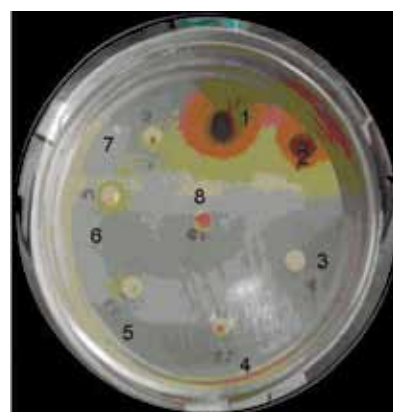


Fig. 1. Halos de inhibición de los extractos hidroalcohólicos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. 1. Té verde 50 %; 2. Té verde 25 %; 3. Alcohol; 4. Llantén 25 %; 5. Llantén 50 %; 6. Coca 25 %; 7. Coca 50 %; 8. Clorhexidina al 0,12 %.

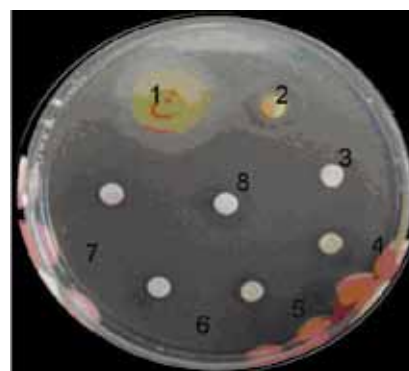


Fig. 2. Halos de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales sobre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314. 1. Té verde 50 %; 2. Té verde 25 %; 3. Alcohol; 4. Llantén 25 %; 5. Llantén de 50 %; 6. Coca 25 %; 6. Coca 50 %; 8. Clorhexidina 0,12 %.

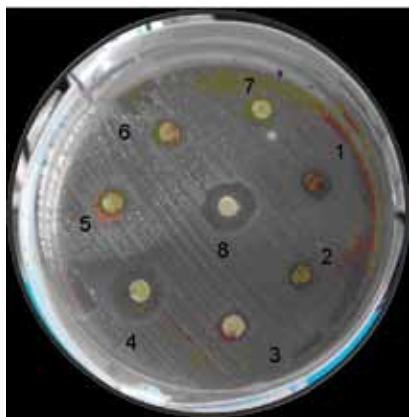


Fig. 3. Halos de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales sobre *Actinomyces viscosus* ATCC 15987. 1. té verde 50 %, 2. té verde 25 %, 3. llantén 25 %, 4. llantén 50 %, 5. coca 25 %, 6. coca 50 %, 7. Alcohol, 8. Clorhexidina 0,12 %

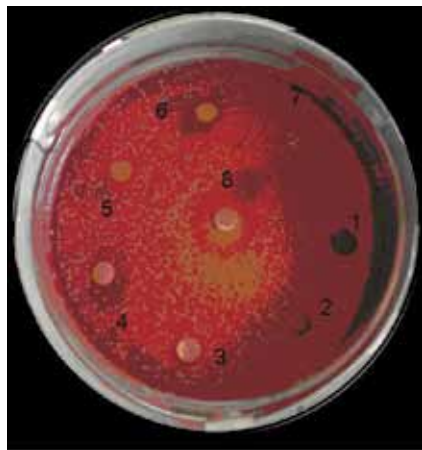


Fig. 4. Halos de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales sobre *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845. 1. té verde 50 %, 2. té verde 25 %, 3. llantén 25 %, 4. llantén 50 %, 5. coca 50 %, 6. coca 25 %, 7. alcohol, 8. Clorhexidina 0,12 %



Fig. 5. Halos de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales sobre *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. 1. té verde 50 %, 2. té verde 25 %, 3. alcohol, 4. llantén 50 %, 5. llantén 25 %, 6. coca 25 %, 7. coca 50 %, 8. Clorhexidina 0,12 %

viscosus, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum* respectivamente.

Discusión

Los extractos obtenidos mediante maceración alcohólica de las hojas de *Plantago major* L. (llantén), *Erythroxylum novogranatense* (Rusby) Plowman var. *truxillense* (coca Trujillo) y *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones de 25 y 50 µg/mL, demostraron tener propiedades antibacterianas *in vitro* sobre cepas de bacterias patógenas orales como: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum* que conforman parte de la microbiota bucal y están implicadas en patologías orales como caries dental y enfermedad periodontal. El comportamiento de los extractos, en términos de tamaño de halo de inhibición, siempre fueron menores a la presentada por el control positivo (PerioAid) y mayores a la del control negativo (alcohol 70 %).

Complementariamente al estudio se realizó el análisis fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos empleados en la investigación, comprobándose que contienen en su composición principios activos a los cuales se les puede atribuir sus propiedades antibacterianas.

Si bien no existen antecedentes que comparen la actividad antibacteriana de los tres extractos empleados en este estudio, los resultados presentados por cada uno de ellos, y analizados de manera individual, coinciden con la investigación realizada acerca de los extractos hidroalcohólicos de *Plantago major*,¹ *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense*^{7, 8, 9} y *Camellia sinensis*.^{2, 10}

En la comparación de la actividad antibacteriana de los tres extractos hidroalcohólicos, *Camellia sinensis* presentó, en ambas concentraciones, los mejores resultados sobre la mayoría de las bacterias patógenas orales, este resultado se explicaría por la presencia de polifenoles, los cuales tienen diferentes mecanismos de acción, entre ellos la inhibición de la producción de ácidos y de la enzima glucosiltransferasa.

Conclusiones

1. Los tres extractos hidroalcohólicos en las diluciones de 25 y 50 µg/mL presentaron actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus aci-*

dophilus, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*.

El efecto antibacteriano aumentó con la concentración en *P. melaninogenica*, que fue la cepa más sensible y *A. viscosus* la menos sensible

2. De la comparación entre los extractos diluidos a 25 µg/mL, los resultados con mayores valores los presentó el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis*, excepto sobre *A. viscosus*; mientras que los menores se observaron con el de *Plantago major* L.

3. De la comparación entre los extractos diluidos a 50 µg/mL, los resultados con mayores valores los presentó el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis*, excepto sobre *F. nucleatum*, en cuyo caso los mayores valores los presento el extracto de *Plantago major* L; en el resto de los casos esta última sustancia registro los menores resultados.

Referencias bibliográficas

1. Cordeiro Cynthia Helena Gontijo, Sacramento Luis Vitor Silva do, Corrêa Marcos Antônio, Pizzolitto Antonio Carlos, Bauab Taís Maria. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2006; 42(3): 395-404.
2. Freitas A, Costa V, Farias E, Lima M, Sousa I, Ximenes E. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. Rev. Bras. Farmacogn. 2002; 12 (supl): 64-65.
3. Borrovic Ramos F. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxillense* (coca) sobre flora mixta salival. Tesis de bachiller para Cirujano Dentista. Lima: UNM-SM; 2006.
4. Yam TS, Hamilton-Miller JM, Shah S. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and B-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998; 42(2): 211-216
5. Carreño M. Efecto cicatrizante del *Plantago major* L (llantén) en heridas incisas de ratones albinos. Tesis de bachiller para optar al título de

- Químico farmacéutico. UNMSM. Lima, 1992.
6. Aguilar Felices E y Encarnación Montalvo J. Comportamiento *in vitro* de *Erythroxyllum coca-Erythroxyllum novogranatense* "Mate de coca" sobre *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*. Tesis de bachiller para Químico farmacéutico. Lima: UNMSM; 1995.
 7. Rodríguez Pargas Ayní, León Padilla María del Carmen, Hernández Rodríguez Alberto, Junco Barranco Jesús. *Actividad antifúngica in vitro de una crema de Plantago major L*. Rev Cubana Plant Med. 1996; 1(3): 9-12.
 8. Bazalar D, Choquesillo F, Milla H; Herrera O, Félix M. Acción Inhibitoria de crecimiento de la asociación de los extractos acuosos de *Erythroxyllum novogranatense* (*Morrys*) VAR. *truxyllense* (*Rusby*) y *Plátano major L*. frente a bacterias y hongos. Ciencia e Investigación. 1998; 1(2)
 9. Navarro D, Santos E, Rocha J, Bremm L, Jukoski M, Ribeiro P, et al. *Efeitos do digluconato de clorexidina, Plantago major e placebo sobre placa dental e gengivite*: Uma comparação clínica da eficácia de colutório. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.1998;1(1): 28-38
 10. Oliveira Franciella, Gobira Bárbara, Guimarães Carolina, Batista Jamylle, Barreto Mariana, Souza Mônica. *Espécies vegetais indicadas na odontologia*. Rev. bras. Farmacogn.2007; 17(3): 466-476.