

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos y chalepentina de *Ruta chalepensis* L. (RUDA) CONTRA *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans*

POR

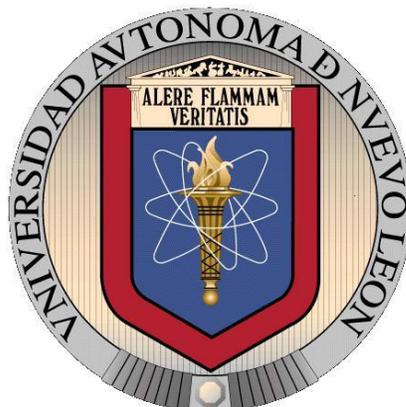
MARCELA ALEJANDRA GLORIA GARZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

ABRIL, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y
CHALEPENSINA DE *Ruta chalepensis* L. (RUDA) CONTRA *Streptococcus mutans*,
Porphyromonas gingivalis y *Candida albicans***

Por

MSP. MARCELA ALEJANDRA GLORIA GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Abril, 2016

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y
CHALEPENSINA DE *Ruta chalepensis* L. (RUDA) CONTRA *Streptococcus mutans*,
Porphyromonas gingivalis y *Candida albicans*

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Director de Tesis

Dr. Ramiro Quintanilla Licea

Secretario

Dra. Patricia Tamez Guerra

Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal

Dra. María Julia Verde Star

Vocal

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y
CHALEPENSINA DE *Ruta chalepensis* L. (RUDA) CONTRA *Streptococcus mutans*,
Porphyromonas gingivalis y *Candida albicans*

Dirección de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Director

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos

Director Externo

DEDICATORIA

A mi gran Dios, a Cristo quien me dio la salvación, vida, salud y fuerza; la oportunidad de crecer profesionalmente, por mantenerme firme y de pie ante las diversas adversidades durante el proceso de este gran proyecto, por ser mi amparo y fortaleza mi pronto auxilio en las adversidades, y darme día a día sabiduría y entendimiento en los momentos que más lo necesitaba...” Todo lo puedo en Cristo que me fortalece” Filipenses 4:13 GRACIAS DIOS.

A mi esposo C.P. Rogelio Fabián García Villaneda por ser un excelente amigo, esposo, compañero y consejero, por su apoyo incondicional, por creer en mí, por acompañarme en los momentos más importantes durante el proceso de este trabajo, por la felicidad que representa en mi vida y ser mi ayuda idónea te amo.

A mis papás, a mi mamá Blanca Esther Garza Sepúlveda por su apoyo incondicional por siempre escucharme por alentarme por ser una gran consejera y guiarme por un buen camino, al Ing. Emilio Gaytán Alanís por sus consejos y apoyo, a mi hermana Mónica Patricia Gloria Garza por apoyarme, a mi sobrino Mateo por hacerme sonreír, y muy especialmente a Papá Genaro Gloria Juárez que estoy segura estaría orgulloso por la presentación de este trabajo. Los quiero con toda mi alma.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme la oportunidad de formar parte de esta gran Institución de reconocimiento internacional, y otorgarme esta formación profesional y permitirme ser parte de esta Institución de importante prestigio.

Al Dr. Ricardo A. Gómez Flores, por creer en mí, por la invaluable oportunidad que me brindó como Cirujano Dentista, por su excelente asesoría y todo el apoyo durante la realización de este trabajo, por ser parte de mi crecer profesional, por su perseverancia, tolerancia y guía en cada momento de mi formación, mi admiración total y respeto para el Doctor como investigador y profesionista.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra, por su amable disposición y su valiosa ayuda en el desarrollo de este trabajo, consejera y gran ser humano.

A la Dra. Myriam A. de la Garza Ramos por su apoyo, por creer en mí como profesionista, por sus consejos profesionales y por fomentar en los odontólogos una mentalidad de científicos-clínicos.

Al Dr. Ramiro Quintanilla Licea, Edgar Mendoza Gamboa y Dr. Julia Verde Star por su apoyo, asesoría y facilidades otorgadas para realizar este trabajo.

A la Biol. Enriqueta Monreal Cuevas por todo su apoyo y orientación durante el proceso de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Uziel Castillo, Humberto Carlos Hernández, Magda Celina Navarro, Raúl Reyna, Juan Ballesteros, Marcela Martínez, Verónica Padilla, Adán Galindo, Elizabeth Terrazas, Nora Mares, Aldo Bazaldúa y Mario Samaniego por su apoyo, sus consejos y por hacer agradable cada momento de mi estancia en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (CVU/Becario: 242099) otorgada a una servidora para la realización de este doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	16
NOMENCLATURA.....	18
RESUMEN.....	20
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUCCIÓN.....	24
2. HIPÓTESIS.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo particular.....	29
3.2 Objetivos particulares.....	29
4. ANTECEDENTES.....	30
4.1 Plantas medicinales.....	30
4.2 Microbiota oral.....	32
4.3 Microorganismos de interés clínico.....	32
4.3.1 <i>Streptococcus</i> del grupo <i>mutans</i>	32
4.3.2 Epidemiología de la caries dental.....	34
4.3.3 Incidencia y Prevalencia.....	35
4.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
4.4.1 Incidencia y prevalencia.....	37
4.5 <i>Candida albicans</i>	38
4.5.1 Incidencia y prevalencia.....	39
4.6 Extractos de plantas y fitoquímicos contra bacterias orales.....	39
4.7 <i>Ruta chalepensis</i> (Ruda).....	40

4.8 Composición química de las plantas.....	42
4.8.1 Lípidos.....	42
4.8.2 Compuestos aromáticos.....	43
4.8.3 Aminas.....	44
4.8.4 Grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas.....	45
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
5.1 Metodología científica.....	48
5.2 Colecta de material vegetal.....	48
5.3 Preparación del material vegetal.....	49
5.4 Reactivos y medios de cultivo.....	49
5.5 Preparación de extractos metanólicos.....	50
5.6 Preparación de extractos etanólicos.....	50
5.7 Preparación de extractos acuosos.....	51
5.8 Activación de cepas de microorganismos.....	52
5.9 Preparación del vehículo metanólico, etanólico, hexano y acetato de etilo	
5.10 Efecto antibacteriano de <i>R. chalepensis</i> contra <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> por el método de reducción del MTT.....	52
5.11 Efecto antifúngico de <i>R. chalepensis</i> contra <i>Candida albicans</i> por el método de reducción del MTT.....	53
5.12 Efecto antimicrobiano de <i>R. chalepensis</i> contra <i>S. mutans</i> , <i>P.</i> <i>gingivalis</i> y <i>C. albicans</i> por el método de unidades formadoras de colonias (UFC).....	54
5.13 Extracción Soxhlet.....	54
5.14 Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana Cromatografía en columna con sílica de gel.....	55
5.15 Cromatografía en columna con sílica gel fase reversa.....	56
5.16 Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20.....	57
5.17 Cromatografía en capa fina (CCF).....	58
5.18 Análisis espectroscópico. Resonancia Magnética Nuclear.....	60

5.19	Espectrometría de masas.....	60
5.20	Determinación del punto de fusión.....	61
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	62
7.	RESULTADOS.....	63
7.1	Colecta e identificación de <i>Ruta chalepensis</i>	63
7.2	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i>	63
7.2.1	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT.....	64
7.2.2	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de UFC.....	67
7.3	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i>	70
7.3.1	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de MTT.....	70
7.3.2	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de UFC.....	74
7.4	Análisis de la actividad antifúngica de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i>	77
7.4.1	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de MTT.....	77
7.4.2	Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i>	

contra <i>C. albicans</i> por el método de UFC.....	81
7.5 Extracción I de 60g de <i>R. chalepensis</i> y evaluación de la actividad antimicrobiana.....	84
7.5.1 Partición del extracto metanólico I de <i>R. chalepensis</i>	84
7.6 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT y UFC.....	85
7.6.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT.....	86
7.6.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de UFC.....	87
7.7 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de MTT y UFC.....	88
7.7.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de MTT.....	88
7.7.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de UFC.....	90
7.8 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de MTT y UFC.....	90
7.8.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de MTT.....	91
7.8.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de	

UFC.....	92
7.9 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT y UFC.....	93
7.9.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT.....	93
7.9.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de UFC.....	94
7.10 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de MTT y UFC.....	95
7.10.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT.....	95
7.10.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de UFC.....	96
7.11 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de MTT y UFC.....	97
7.11.1 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de MTT.....	97
7.11.2 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de UFC.....	99

7.12 Fraccionamiento cromatográfico biodirigido de la extracción I.....	99
7.13 Análisis de la actividad antibacteriana de chalepensina	
<i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por el método de MTT y UFC.....	102
7.13.1 Análisis de la actividad antibacteriana de	
chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por	
por el método de MTT.....	102
7.13.2 Análisis de la actividad antibacteriana de	
chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> por	
por el método de UFC.....	103
7.14 Análisis de la actividad antibacteriana de chalepensina	
<i>in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por el método de MTT	
y UFC.....	104
7.14.1 Análisis de la actividad antibacteriana de	
chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por	
por el método de MTT.....	104
7.14.2 Análisis de la actividad antibacteriana de	
chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> por	
por el método de UFC.....	105
7.15 Análisis de la actividad antibacteriana de chalepensina	
<i>in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por el método de MTT	
y UFC.....	106
7.15.1 Análisis de la actividad antibacteriana de	
chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por	
por el método de MTT.....	106
7.15.2 Análisis de la actividad antibacteriana de	
chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> por	
por el método de UFC.....	107
7.16 Resultados espectroscópicos.....	108
7.16.1 Análisis espectrofotométrico y espectroscópico del	

Compuesto C1.....	108
7.17 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear.....	110
8. DISCUSIÓN.....	119
9. CONCLUSIONES.....	123
10. LITERATURA CITADA.....	125
11. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	132

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Compuestos activos de plantas y solventes.....	44
2. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.....	46
3. Clasificación taxonómica de <i>Ruta chalepensis</i>	49
4. Características del material vegetal. AR, Arramberri.....	63
5. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (MTT).....	64
6. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>S. mutans</i> (MTT).....	65
7. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>S. mutans</i> (MTT).....	66
8. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (UFC).....	67
9. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>S. mutans</i> (UFC).....	68
10. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>S. mutans</i> (UFC).....	69
11. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P.gingivalis</i> (MTT).....	71
12. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>P. gingivalis</i>	

(MTT).....	72
13. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>P. gingivalis</i> (MTT).....	73
14. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> (UFC).....	74
15. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>P. gingivalis</i> (UFC).....	75
16. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>P. gingivalis</i> (UFC).....	76
17. Efecto de la actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (MTT).....	78
18. Efecto de la actividad antifúngica del extracto acuoso de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (MTT).....	79
19. Efecto de la actividad antifúngica del extracto etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (MTT).....	80
20. Efecto de la actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (UFC).....	81
21. Efecto de la actividad antifúngica del extracto acuoso de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (UFC).....	82
22. Efecto de la actividad antifúngica del extracto etanólico de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (UFC).....	83
23. Peso seco y porcentaje de rendimiento del material vegetal.....	84
24. Rendimientos de la partición con hexano y acetato de etilo del extracto metanólico de <i>R. chalepensis</i>	85
25. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (MTT).....	86

26. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (UFC).....	87
27. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> (MTT).....	89
28. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> (UFC).....	90
29. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación <i>C. albicans</i> (MTT).....	91
30. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción hexánica de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación <i>C. albicans</i> (UFC).....	92
31. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (MTT).....	93
32. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (UFC).....	94
33. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación <i>P. gingivalis</i> (MTT).....	95
34. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación <i>P. gingivalis</i> (UFC).....	96
35. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación <i>C. albicans</i> (MTT).....	98
36. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>R. chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación <i>C. albicans</i> (UFC).....	99
37. Rendimiento FC de la columna 1.....	100
38. Rendimientos de FC de la columna 2.....	102
39. Efecto de la actividad antibacteriana de chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (MTT).....	103
40. Efecto de la actividad antibacteriana de chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> (UFC).....	104
41. Efecto de la actividad antibacteriana de chalepensina <i>in vitro</i> contra	

<i>P. gingivalis</i> (MTT).....	105
42. Efecto de la actividad antibacteriana de chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>P. gingivalis</i> (UFC).....	106
43. Efecto de la actividad antifúngica de chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (MTT).....	107
44. Efecto de la actividad antifúngica de chalepensina <i>in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> (UFC).....	108
45. Resumen de señales del espectro de ¹ H-RMN de C1.....	111
46. Acoplamientos registrados COSY del compuesto C1.....	113
47. Resumen de señales del espectro de ¹³ C-RMN del compuesto C1.....	115
48. Resumen de correlaciones del espectro de HSQC y HMBC del compuesto C1.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Streptococcus mutans</i>	33
2. Caries dental.....	34
3. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	36
4. Periodontitis crónica.....	37
5. <i>Candida albicans</i>	38
6. <i>Ruta chalepensis</i>	41
7. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	48
8. Preparación de extractos metanólicos.....	50
9. Preparación de extractos etanólicos.....	51
10. Preparación de extractos acuosos.....	52
11. Activación de cepas microbianas.....	52
12. Metodología contra bacterias <i>in vitro</i>	53
13. Metodología contra levaduras <i>in vitro</i>	53
14. Metodología contra bacterias y levaduras <i>in vitro</i>	54
15. Extractor Soxhlet.....	55
16. Componentes de columna cromatográfica de 160cm de longitud (silica fase normal).....	56
17. Componentes de la cromatografía en columna en fase reversa C ₁₈ ...	57
18. Cromatografía en columna de exclusión Sephadex LH-20.....	58
19. Desarrollo de una CCF dentro de una cámara cromatográfica.....	59
20. Cromatografía en capa delgada bajo luz UV (254nm).....	59
21. Espectro de ¹ H-RMN.....	60
22. Espectro de (+)-ESI-MS.....	61
23. CCF de FC de Columna 1. Eluente: CHCl ₃ :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml).	

Revelador: luz UV a 254 nm.....	100
24. CCF de fracciones correspondientes a Columna 2. Eluente: CHCl ₃ (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.....	102
25. Espectro de masas (+)-ESI-MS del compuesto C1	109
26. Espectro de masas de alta resolución (+)-HR-ESI-MS del compuesto C1	110
27. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C1 en CDCl ₃	110
28. Espectro general de COSY del compuesto C1 en CDCl ₃	112
29. Ampliación del espectro COSY del compuesto C1 en CDCl ₃	113
30. Espectro de ¹³ C-RMN del compuesto C1 en CDCl ₃	114
31. Espectro de HSQC del compuesto C1 . A, espectro general de HSQC. B, ampliación del espectro de HSQC. ¹ H: 4.5-8.5ppm ¹³ C: 80-165ppm...116	116
32. Estructura del compuesto C1 , chalepentina.....	118

NOMENCLATURA

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grados Celsius
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
cm	Centímetros
CO ₂	Bióxido de carbono
COSY	Espectroscopía de correlación
d (mult)	Doblete
dd (mult)	Doble doblete
DMSO	Dimetilsulfóxido
E _t OAc	Acetato de etilo
EI	Ionización de impacto de electrones
ESI-HR	Ionización de electrospray de alta resolución
FC	Fracción colectiva
g	Gramos
h	Horas
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protones
HSQC	Coherencia cuántica heteronuclear simple
HMBC	Coherencia cuántica heteronuclear múltiple
ICC	Medio de cultivo para bacterias (infusión cerebro-corazón)
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro

MHz	MegaHertz
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
m/z	Relación masa-carga
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
YM	Medio de cultivo para levaduras (yeast medium)
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µg/mL	Microgramos por mililitro

RESUMEN

Las enfermedades bucodentales más comunes como la caries dental, la enfermedad periodontal y la candidiasis oral, manifestadas en pacientes con distintos tipos de factores predisponentes, son consideradas un importante problema de salud pública bucal. El uso de antibióticos convencionales para su tratamiento puede crear resistencia microbiana, por lo que se hace indispensable la búsqueda de alternativas para las cuales no existe tal efecto, como la planta *Ruta chalepensis* L. (Ruda) que se usa para el tratamiento de reumatismo, hipertensión, y como antiséptico cutáneo, anticonvulsivo, antihelmíntico y emenagogo. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de *Ruta chalepensis* y sus compuestos bioactivos contra el principal agente etiológico de caries dental, *Streptococcus mutans*, de la enfermedad periodontal, *Porphyromonas gingivalis* y contra *Candida albicans* especie mayormente asociada a la infección micótica bucal. Para determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos se utilizó el método de cultivo en medio sólido (unidades formadoras de colonias –UFC-) y líquido (reducción del bromuro de tetrazolio -MTT-). Se realizó la partición de los extractos metanólicos en hexano y acetato de etilo para evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones. Se utilizaron técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de masas para corroborar la naturaleza química general de los posibles compuestos bioactivos presentes en los extractos y definir su estructura química. Con el extracto metanólico y las fracciones hexánica y con acetato de etilo de *R. chalepensis* se redujo la actividad/población de *S. mutans* en un 63% y 92%; 60.51% y 39.12%; y 48.7% y 30.68% a la dosis de 500µg/mL por los métodos de MTT y UFC, respectivamente. De igual forma, con el extracto metanólico de *R. chalepensis* se redujo la actividad/población de *P. gingivalis* en un 24.8% y 46.09% a 500µg/mL por los métodos de MTT y UFC, respectivamente, y redujo la actividad/población de *C. albicans* en un 9.45% y 31.36% por los métodos de MTT y UFC, respectivamente.

Del fraccionamiento cromatográfico usando las técnicas de RMN y espectrometría de masas se identificó el compuesto chalepensina. Este mostró un efecto antimicrobiano y antifúngico, pues redujo la población de *S. mutans* en un 77% y 71%; la de *P. gingivalis* en un 18.75% y de 24.04% y la de *C. albicans* en 20.22% y 24.14% a la dosis de 500µg/mL por los métodos de MTT y UFC, respectivamente. Nuestros resultados indican que el efecto antimicrobiano de *R. chalepensis* se podría atribuir a la presencia de furanocumarinas.

ABSTRACT

The most common oral diseases such as dental caries, periodontal disease and oral thrush, manifested in patients with different predisposing factors, are considered an important Public Health problem. The use of conventional antibiotics for treatment can create microbial resistance, therefore, it is critical to search for alternatives for which there is no such an effect, as the plant *Ruta chalepensis* L. (Ruda) used for treating rheumatism is essential, hypertension, and as a skin antiseptic, anticonvulsant, deworming, and emmenagogue. The objective of this research was to evaluate the in vitro antimicrobial effect of aqueous extracts, methanolic and ethanolic and bioactive compounds of *Ruta chalepensis* against the major etiological agent of dental caries, *Streptococcus mutans*, periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* and against *Candida albicans* species mostly associated with oral fungal infection. To determine the antimicrobial effect in vitro method of the extracts in solid medium culture (colony forming units -UFC-) and liquid (reduced -MTT- tetrazolium bromide) was used. Partitioning the methanol extract in hexane and ethyl acetate was conducted to evaluate the antimicrobial activity of the fractions. Spectroscopic nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectroscopy were used to confirm the general chemical nature of possible bioactive compounds present in the extracts and define its chemical structure. The methanol extract *R. chalepensis* showed antibacterial activity against *S. mutans* from 63% to 500 μ g / mL by the method of MTT and 92% at 500 μ g / mL by the method of UFC, while the methanol extract of *R. chalepensis* He showed an antibacterial activity against *P. gingivalis* 24.8% at 500 μ g / mL by the MTT method and 46.09% by the method of UFC, while the methanol extract showed antifungal activity against *C. albicans* of 9.45% by the method of MTT and 31.36% by the method of UFC. The antimicrobial activity of the hexane fraction was assessed on *S. mutans* activity showing 60.51% to 500 μ g / mL by the MTT method and 39.12% at 500 μ g / mL by the method of UFC, while the ethyl acetate fraction showed antimicrobial activity against *S. mutans* of 48.7% at 500 μ g / mL by the MTT method and 30.68% at 500 μ g / mL by the method of

UFC. Using chromatographic fractionation combined with NMR and mass spectrometry, the chalepsin compound was identified.

Chalepsin antimicrobial and antifungal evaluations revealed to result in antimicrobial effect against *S. mutans* (77% to 500 μ g / mL by the MTT method and 71% by the method of UFC, its effect on *P. gingivalis* was 18.75% at 500 μ g / mL by the MTT method and 24.04% by the method of UFC, while activity was about 20.22% *C. albicans* to 500 μ g / mL by the MTT method and 24.14% by the method of UFC. Overall, results indicated that *R. chalepensis* antimicrobial effect may be conferred by the presence of furanocoumarins.

1. INTRODUCCIÓN

Es indudable la importancia de las plantas para la medicina moderna; durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico. Todas las culturas y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Núñez, 1982).

Los fármacos están ligados a un sistema de salud “moderno”, que por sus características tiende a la sofisticación tecnológica, a la deshumanización, a una visión restringida del concepto de salud y enfermedad y al menosprecio de muchos valores culturales. Por el contrario, en el contexto tradicional, las plantas medicinales están ligadas a una concepción distinta del ser humano y de la naturaleza; no es sólo que ellas sean menos tóxicas o más fáciles de conseguir, o incluso sean más eficaces, sino que las plantas medicinales devuelven la mirada a la naturaleza, a la armonía del ser humano con su entorno y a una cultura donde lo vegetal, en términos de salud, también tiene propiedades curativas que ofrecer. De hecho, más del 30% de los fármacos empleados en la actualidad proceden o han sido sintetizados a partir de productos naturales procedentes de plantas.

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las infecciones, tanto bacterianas como micóticas, representan un grupo importante de padecimientos con procesos inflamatorios, que en algunos casos incapacitan a quienes las padecen (Choi y col., 2003). Las enfermedades bucodentales continúan siendo un importante problema de salud a nivel mundial (Petersen, 2005). Problemas como el cáncer orofaríngeo y las lesiones en tejidos blandos son consideradas problemas de salud oral; sin embargo, la caries dental, la enfermedad periodontal y la candidiasis oral son consideradas las más importantes (Petersen, 2003). La caries dental es una enfermedad infecciosa transmisible que continúa representando un importante problema de Salud Pública en muchos países en desarrollo y en las poblaciones desfavorecidas en países desarrollados (Mattos y col., 1998; Ramos y col., 2002).

Streptococcus mutans es considerado uno de los principales agentes etiológicos de la caries dental (Becker y col., 2000; Loesche, 1986). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 5 billones de personas en todo el mundo sufren de caries dental, la cual afecta entre el 60% y el 90% de la población escolar y a la gran mayoría de los adultos en los países desarrollados. En México se calcula que el 44% de la población tiene caries o una enfermedad bucal que afecta a su salud sistémica (OMS, 2004).

La enfermedad periodontal es una entidad que se encuentra distribuida universalmente y es de las más extendidas entre todas las enfermedades que el hombre ha padecido desde tiempos prehistóricos. Diversos estudios sugieren que las periodontopatías ocupan el segundo lugar en los problemas de salud bucal mundial y son la mayor causa de pérdida de dientes después de los 35 años, edad a partir de la cual los dientes que se pierden por dicha afección (Araujo y Borroto, 1997).

La etiología de la enfermedad periodontal inflamatoria está condicionada a la acción de múltiples factores de riesgo, que inician y modifican la respuesta del hospedero. Hoy se considera que los microorganismos de la placa dentobacteriana, la microbiota del surco gingival y sus productos metabólicos son iniciadores de la enfermedad (Clark y Loe, 2000). Numerosos estudios han demostrado que las enfermedades periodontales son de naturaleza infecciosa y que los microorganismos presentes en la placa bacteriana, localizada en la región del surco gingivo-dentario o placa subgingival, constituyen el agente etiológico principal de las enfermedades (Genko y col., 2006., 1969; Ellison, 1970; Socransky y col., 1977). Las bacterias colonizan la superficie dentaria en la región del surco gingivodentario, donde se multiplican y se extienden en dirección apical, formando la placa subgingival o biofilm bacteriano subgingival, el cual es responsable de albergar un gran número de especies bacterianas. Se han descrito más de 500 de éstas especies, entre las cuales, las de mayor prevalencia en la periodontitis son *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, principalmente (Zambon, 1996). De la antes mencionadas, *P. gingivalis* es una de las especies más fuertemente asociadas con periodontitis crónica y periodontitis agresiva (Zadeh y col., 1999).

La candidiasis oral es una infección oportunista de la cavidad oral, *Candida albicans* es el oportunista que principalmente causa infecciones orales. La presencia de *Candida* en la cavidad oral es frecuente y oscila entre un 20% y un 70%, su incidencia va en aumento en los países desarrollados debido a diferentes factores como el uso de prótesis dentales, xerostomía, múltiples terapias con antibióticos e inmunosupresores (Aguirre, 1992). La aparición de candidiasis implica la invasión de la superficie de la mucosa por el hongo. La posibilidad de que *Candida* colonice las superficies orales depende tanto de la efectividad de los mecanismos defensivos del hospedador, como de la capacidad de adhesión del hongo y de su poder de crecimiento (Samaranayake y Macfarlane, 1990).

La necesidad existente de prevención y control de las enfermedades bucodentales tales como la caries dental, la enfermedad periodontal y la candidiasis oral permite el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos alternativos (Prabu y col., 2006). Existen diversas plantas de la flora medicinal mexicana que poseen actividad antimicrobiana y que se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades humanas (Pushpam, 2004). *Ruta chalepensis* es una planta comúnmente conocida como ruda, ruda menor, ruda pestosa, abrua, arruda, hierba piojera o ruda silvestre, que se seleccionó debido a que se recomendaba para tratar infecciones y por ser regional. El estudio se llevó a cabo para buscar alternativas de tratamientos contra infecciones como estrategia de salud en general y salud bucodental en particular.

En este trabajo se evaluó el efecto de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de ruda, como agente antimicrobiano contra *S. mutans*, agente etiológico de caries dental, y *P. gingivalis*, agentes etiológicos de enfermedad periodontal, además en contra del agente causante de infecciones micóticas orales *C. albicans*. Se realizó la partición de los extractos metanólicos de las plantas con mayor actividad antimicrobiana y/o antifúngica utilizando como solventes hexano y acetato de etilo y se probó la actividad biológica de cada fase, utilizando técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de masas para determinar la estructura química de los compuestos presentes.

2. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de ruda y sus compuestos activos poseen actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Porphyromona gingivalis* y *Candida albicans*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano e identificar de los compuestos bioactivos presentes en los extractos acuoso, etanólico y metanólico de ruda para el control de *Streptococcus mutans*, *Porphyromona gingivalis* y *Candida albicans*

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromona gingivalis* de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de ruda.
2. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* contra *Candida albicans* de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de ruda.
3. Determinar la actividad antimicrobiana de fracciones de hexano y acetato de etilo de los extractos metanólicos de ruda.
4. Identificar la fracción con mayor actividad antimicrobiana para definir la estructura química del compuesto(s) bioactivo.

4. ANTECEDENTES

Las enfermedades bucodentales continúan siendo un importante problema de salud a nivel mundial (Petersen, 2005). Problemas como el cáncer orofaríngeo y las lesiones en tejidos duros y blandos son consideradas problemas de salud oral, sin embargo, la caries dental y la enfermedad periodontal se consideran las más importantes (Petersen, 2003). Existen diversas plantas de la flora medicinal mexicana que poseen actividad antimicrobiana y que se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades humanas (Pushpam, 2004).

4.1 Plantas Medicinales

En las culturas antiguas, los conocimientos acerca de las plantas medicinales se han transmitido de generación a generación a través de personas que, utilizaban tales conocimientos para la sobrevivencia de la población (Villalba-Caloca y col., 2000).

Las plantas medicinales se han utilizado como tratamientos tradicionales para numerosas enfermedades que han afectado al ser humano durante muchos años y en diferentes partes del mundo. La OMS ha realizado estrategias sobre medicina tradicional con cuatro objetivos principales, los cuales son: formular políticas, fomentar la seguridad, la eficacia y la calidad, garantizar el acceso y promover el uso racional. Para la OMS la medicina tradicional es la suma total del conocimiento, habilidades y prácticas basadas en las teorías, en la creencia, y las experiencias indígenas en diversas culturas, sean susceptibles de explicación o no. En las zonas rurales en los países en desarrollo, se continúan usando como principal fuente de medicina (Chitme y col., 2003). Alrededor del 80% de los países en desarrollo utilizan medicinas tradicionales para el cuidado de su salud (Kim, 2005).

Es así como los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas

permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, en los últimos años más de la mitad de los productos farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales (Newman y Cragg, 2007). El empleo y comercialización de plantas medicinales han sido estimulados, en parte, por la creciente demanda de la industria por nuevas fuentes naturales de medicamentos y por otro lado, debido a los efectos colaterales causados por los fármacos sintéticos que estimulan el aprovechamiento de medicinas de origen vegetal, o en muchos casos, porque representan la única fuente de medicamentos, especialmente en los lugares más aislados y distantes y como respuesta a los problemas inmediatos de salud (De Filippis, 2001).

Los productos naturales derivados de plantas medicinales han demostrado ser una fuente importante de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido la base para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Para que una planta sea considerada medicinal debe contener en alguno de sus órganos (hoja, tallo, fruto, flores, raíz, semilla) compuestos activos, de los cuales en dosis suficientes produzcan efectos curativos en contra de las enfermedades del hombre y de los animales. Se tiene un estimado de 250,000 especies de plantas que se conocen en la actualidad, de las cuales el 10% se pueden considerar medicinales, por presentar algún uso terapéutico (Murphy, 1999).

Los productos naturales se han convertido en fuente de hallazgos de numerosas drogas desde el siglo XIX hasta la actualidad, como es el caso de la morfina a partir del opio, identificándola como el compuesto responsable de dicha planta. Actualmente existe alcaloides conocidos como la cafeína y la codeína, otros ejemplos de fármacos extraídos de la naturaleza son la gramicina, primer antibiótico obtenido de bacterias del suelo, y el ácido salicílico analgésico extraído por primera vez de la corteza del sauce (Ravaschino, 2007).

Con respecto a las enfermedades causadas por microorganismos, el aumento en la resistencia de muchos patógenos comunes a los agentes terapéuticos usados en la actualidad, como los antibióticos y los agentes antivirales, ha llevado renovar el interés

en el descubrimiento de nuevos compuestos para lograr la supresión de estos agentes causales de enfermedades sistémicas y orales (Cowan, 1999).

4.2 Microbiota oral

La microbiota es el conjunto de agentes vivos que se localizan en un lugar determinado, de forma habitual (microbiota normal) o no. En el hombre existe una microbiota normal que recubre los epitelios, cutáneos y mucosos. Está formada fundamentalmente por bacterias. En el ecosistema oral existen más de 300 especies microbianas en constante interrelación y dinamismo (Mouton, 1995; Liébana, 2002). En esta acción las especies microbianas en continuo anabolismo y catabolismo, tomando nutrientes y aportando productos de su metabolismo al medio oral, pueden producir equilibrio o desequilibrio químico y microbiológico en la cavidad oral. Las interrelaciones que se dan en equilibrio entre especies microbianas en un mismo nicho ecológico pueden ser alteradas por una modificación en el medio ambiente oral, que trae como consecuencia el predominio de una población (Liébana, 2002).

Al nacer el neonato entra en contacto con la madre, 8 horas después presenta una gran cantidad de microorganismos que se incrementan con rapidez (lactobacilos, estreptococos, estafilococos, enterococos, veillonellae, neisseriae y coliformes) (Söderling y col., 2001).

4.3 Microorganismos de interés clínico

4.3.1. *Streptococcus* del grupo *mutans*

Los *Streptococcus* del grupo *mutans* (MS) comprenden siete especies: *Streptococcus cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. macacae* y *S. ferus* (Whiley y Beighton, 1998). *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son los principales microorganismos asociados con la caries dental en el ser humano (Hamada y Slade, 1980; Whiley y Beighton, 1998). Estas especies han sido descritas por Clarke en 1924, a partir de caries de dentina. Su primer hábitat es la superficie dentaria del hombre, pero también pueden ser identificados en fauces. Su presencia en la placa bacteriana se ve

favorecida por el alto nivel de sacarosa en la dieta. *Streptococcus mutans* (Figura 1) es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental.



Figura 1. *Streptococcus mutans*

Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. Es acidófilo porque vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentarias) e intracelulares (metabolismo energético). En estado de salud, un recuento de estas bacterias en boca será de menos de 100.000 UFC. Ecológicamente, la caries dental (Figura 2) es considerada consecuencia de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una flora, antes considerada normal en cavidad oral y ahora convertida en patógena (Liébana, 2002).



Figura 2. Caries dental

4.3.2. Epidemiología de la caries dental

La caries dental es una enfermedad infecciosa transmisible que continúa representando un importante problema de salud pública (Mattos y col., 1998; Ramos y col., 2002). La Organización Mundial de la Salud estima que 5 billones de personas en todo el mundo sufren de caries dental. El alto porcentaje de niños con caries obtenidos de países del primer mundo han demostrado que el 17% de niños entre 1.5 y 4.5 años, el 33% de niños entre de 5 y 8 años y el 50% de niños mayores de 8 años han tenido historia de caries en la dentición temporaria, calculándose que la caries alcanzará el tejido pulpar en 2.9 dientes (Ketterl, 1994).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), en su informe de salud oral de 1997, afirmó que la caries dental sigue siendo un aspecto fundamental de las condiciones generales de salud en las Américas, por la importancia que tiene como parte de la carga global de morbilidad, los costos relacionados con su tratamiento (de operatoria y rehabilitación oral), pérdida de dientes y la posibilidad de aplicar medidas eficaces de prevención (OPS/OMS, 1997). Estados Unidos Mexicanos, de acuerdo con la clasificación Internacional de la Organización Mundial de la Salud, se encuentra entre los países de más alto rango de frecuencia de enfermedades bucales, entre ellas se encuentra la caries dental, que afecta a más del 90% de la población mexicana.

Las enfermedades bucales por su alta morbilidad, se encuentran entre las cinco de mayor demanda de atención en los servicios de salud del País (Secretaría de Salud, 2006). En México la presencia de caries dental afecta a cerca del 95% de los niños menores de ocho años de edad y a 99% de los adultos (Petersen, 2003).

4.3.3. Incidencia y Prevalencia

De las enfermedades infecciosas que afectan a la humanidad, la caries dental puede ser una de las más prevalentes; existe en todo el mundo, aunque su incidencia, prevalencia y gravedad varía de acuerdo a los hábitos culturales, zonas geográficas o niveles de desarrollo económicos y fluctúa con el tiempo; siendo los hábitos culturales y la

disponibilidad de alimentos, de los factores más decisivos en la formación de caries (Caufield y Griffen, 2000). La prevalencia de la caries dental experimentada por los niños en los países desarrollados, se ha observado un rápido aumento de esta enfermedad, que se ha relacionado con un incremento de azúcar en la dieta, hasta el punto de alcanzar niveles epidemiológicos; también existen poblaciones con niveles socio económicos tan bajos, que no se pueden permitir el consumo de azúcar refinado, siendo en estos casos baja la incidencia y prevalencia de caries (Nikiforuk, 1986).

4.4 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (Figura 3) bacilo Gram negativo pequeño (cocobacilo), no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, formador de colonias “pigmentadas de negro” uniformes de color verdosas, debido a la hemina que almacena en la superficie celular cuando se cultiva en agar sangre con hemina y menadiona (Slots y col., 1986; Haffajee y Socransky, 1994; Dahlén y col., 1989). Las células de *P. gingivalis* tienen un diámetro de 0.5-0.8µm por 1.0-3.5µm de largo (Genko y col., 1998). Es un importante miembro de la microbiota periodontal, involucrado tanto en la progresión de la periodontitis, como en los procesos de destrucción de hueso y tejido (Holt y col., 1999).



Figura 3. *Porphyromonas gingivalis*

También, puede producir severas infecciones extraorales, incluyendo mediastinales, de planos faciales, cerebro y abscesos pulmonares (Genko y col., 1998), enfermedades

cardíacas, parto prematuro y bajo peso al nacer (Dasanayake, 1998). Se puede detectar en pacientes jóvenes con gingivitis, y pacientes adultos con periodontitis, usando métodos inmunológicos y de biología molecular (PCR). Esta especie también se ha encontrado en placas supragingivales maduras, de pacientes jóvenes con o sin destrucción periodontal, sugiriendo que es un patógeno de tipo oportunista, para el cual no está claro aún, si es de origen endógeno o exógeno (Ishikawa y Baheni, 2004). *P. gingivalis* es una especie proteolítica, asacarolítica, anaerobia estricta, por lo que coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja, pero en los cuales hay sustratos abundantes en nitrógeno. El ecosistema subgingival proporciona un medioambiente ideal para esta especie, ya que, el potencial redox es bajo (y más bajo aún en sacos periodontales), y posee nutrientes endógenos ricos en péptidos y aminoácidos (Olsen y col., 1999). *P. gingivalis* es considerado por tanto, como uno de las especies más fuertemente asociadas con periodontitis crónica (Figura 4) y periodontitis agresiva y usualmente está entre los más tardíos colonizadores de la cavidad oral, requiriendo de organismos antecesores que creen las condiciones medioambientales necesarias, para su adherencia, suministrando sustratos para su crecimiento, y reduciendo los niveles de oxígeno a niveles bajos, que es lo que requiere para crecer y sobrevivir esta especie anaerobia estricta (Zade y col., 1999).



Figura 4. Periodontitis crónica

4.4.1 Incidencia y Prevalencia

En relación a la enfermedad periodontal, según la OMS en el año 2004 la falta de diagnóstico y tratamiento oportuno permite que esta enfermedad evolucione a estados severos, que se acompañan de la pérdida de los dientes; este padecimiento afecta entre el 5-15% de la población general. Durante la pubertad puede presentarse condiciones severas de periodontitis que causa la pérdida prematura de los dientes, situación que afecta al 2% de los jóvenes, el principal factor etiológico local es la placa dental bacteriana, aunado a un factor sistémico hormonal (Zambon, 1985). Es la que constituye la mayor parte de las enfermedades periodontales a partir de los 35 años, se caracteriza por ser de evolución lenta a lo largo de toda la vida del individuo. De los problemas de salud de mayor prevalencia entre las comunidades encontramos las afecciones bucodentales constituidas principalmente por la caries dental y la enfermedad periodontal, estas son diversas así como sus factores etiológicos y predisponentes por lo que se pueden considerar enfermedades multifactoriales que afectan de diferente manera la cavidad bucal, encontrándose íntimamente relacionadas con bajos niveles de higiene bucal, la presencia de placa y cálculo dental (Petersen, 2003).

4.5 *Candida albicans*

Candida albicans (Figura 5) es una levadura que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 μm). Asimilan y fermentan azúcares. Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 μm de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura (Pontón y col., 2002).



Figura 5. *Candida albicans*

La candidiasis o candidosis es la infección micótica oral más frecuente ha sido definida como la “enfermedad del paciente enfermo” ya que siempre precisa uno o más factores facilitadores para poder provocar patología en la boca. La forma pseudomembranosa de la candidiasis oral o muguet es la presentación clínica. La aparición de candidiasis implica la invasión de la superficie de la mucosa por el hongo (Samaranayake y Macfarlane, 1990)

4.5.1 Incidencia y Prevalencia

La incidencia de candidiasis oral está en aumento en los países desarrollados debido a diferentes factores como la generalización del uso de prótesis dentales, xerostomía, múltiples terapias con antibióticos, inmunosupresores, antineoplásicos e inmunodeficiencias (Appleton, 2000). En los últimos 20 años se observó un importante incremento en las infecciones producidas por levaduras, debido probablemente a la utilización de procedimientos de diagnóstico y/o terapéuticos agresivos, así como al Incremento de pacientes inmunocomprometidos (Clark y Hajjeh, 2002).

De las aproximadamente 150 especies del género *Candida*, sólo un pequeño número causa infecciones en humanos. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* son las especies más frecuentemente aisladas de diversos materiales. La presencia de *Candida* en la cavidad oral es frecuente y oscila entre un 20% y un 70% según diversos estudios. En pacientes hospitalizados las especies de *Candida* ocupan el cuarto lugar en orden de frecuencia en las infecciones del torrente sanguíneo en los Estados Unidos. Su

incidencia varía en relación con el espacio geográfico, el grupo etario considerado, el período analizado y el estado inmunológico de los pacientes (Calderone, 2002).

4.6 Extractos de plantas y fitoquímicos contra bacterias orales

Existen diversos estudios realizados *in vitro* que investigan la actividad de sustancias de plantas naturales y su efecto contra bacterias orales; estos estudios han sido enfocados contra bacterias conocidas asociadas a la etiología de enfermedades orales y dentales (Pushpam, 2004). Estudios recientes claramente han demostrado tener potencial para ser utilizados en la industria dental, dada su actividad contra bacterias cariogénicas y contra aquellas bacterias asociadas a enfermedad periodontal.

Sustancias que exhiben actividad incluyen extractos de especias y hierbas tales como aceite de la corteza de canela, aceite de clavo, constituyentes de estos como el eugenol (Saeki y col., 1989). Estudios previos han comprobado que las plantas contienen una diversa cantidad de compuestos llamados fitoquímicos que tienen potencial antimicrobiano entre ellos se han mencionado fenoles, polifenoles, terpenoides, alcaloides, flavonoides, saponinas, polisacáridos y polipéptidos (Cowan, 1999; Sampaio y col., 2009; Zambrana, 2005).

4.7 *Ruta chalepensis* (Ruda)

Es una planta perenne con base leñosa, desnuda y aromática, llegando a medir de 2-6dm de altura, tiene tallos redondos y hojas finas verde azulado. Las flores son amarillas en conjunto poco tupidos en la parte terminal de la planta. Los frutos son unas cápsulas con cuatro o cinco divisiones. La planta tiene un olor penetrante. Se extiende por todo el Mediterráneo, islas Canarias, Cabo Verde, Azores y Madeira en el oeste de la península arábiga además de estar ampliamente distribuida en el continente americano. *R. chalepensis* es una planta que presenta actividad antimicrobiana contra *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* debido a la presencia de compuestos derivados de quinolonas (Jang-Hee y col. 2005); también exhibe actividad larvicida proporcionada

por furanocumarinas y alcaloides quinolínicos (Emam y col. 2009) también se ha demostrado que plantas de la familia *Rutaceae* presentan actividad tripanocida (Atta-ur-Rahman y col., 1998; López and Wagner, 1997; Biavatti y col., 2002) (Figura 6).



Figura 6. *Ruta chalepensis*

El uso de la ruda data desde el siglo XVI (Hnatyszyn y col., 1974). Se emplea en algunos trastornos de carácter ginecobiológico como "regular la regla" o provocarla, en dolores de menstruación, baños para parturientas, ayudar para un parto rápido, para la esterilidad femenina, elimina dolores postparto, además actúa como lactógeno, emenagogo y abortivo.

La ruda es considerada por los médicos tradicionales como una planta "caliente", por lo que las parteras recomiendan a las mujeres embarazadas que no ingieran infusiones, decocciones u otro tipo de preparados que contengan ruda y otras plantas de naturaleza caliente como la canela (*Cinnamomum zeylanicum*), perejil (*Petroselinum sativum*), orégano (*Origanum vulgare*) u otros, ya que las embarazadas tienen mucho "calor" en el cuerpo y si agregan elementos "calientes", puede ser perjudicial para la mujer y el feto. Sin embargo, al iniciarse el trabajo de parto se les administran a las parturientas tés de plantas calientes, entre las que se encuentra la ruda, para acelerar el parto.

Se usa también para aliviar dolores de cabeza, dolor de oídos, muscular y en punzadas. En cuanto al sistema digestivo, tiene importancia para estimular el apetito y como

antigastrálgico, o en problemas gastrointestinales como antidiarréico, y para expulsar a los gusanos intestinales. Entre otros padecimientos, la ruda es utilizada para quitar la fiebre, llagas en la garganta, inflamación de pies, mareos, curar el chincual, nervios, frialdad, cálculos renales, ataques, alferecía, para el latido, presión arterial, otitis de animales, combatir ruidos y sorderas, aire en oídos y ojos, contra el histérico, cura las perrillas, los ojos irritados y actúa como antiinflamatorio.

La manera más generalizada de suministrar la ruda es en forma de té, donde las ramas son la parte más utilizada de la planta. Pero a esta decocción se le puede agregar un poco de chocolate y se endulza, esto para los casos de dolor de cabeza, hay quienes además le agregan una yema de huevo y se lo toman en ayunas. Las mujeres embarazadas no deben tomar la infusión porque les provocaría un aborto. Para las enfermedades de la piel, la ruda se deja macerar en alcohol por unos días y luego se aplica en el cuerpo frotándolo con este líquido o se puede sustituir el alcohol por aguardiente y tomarlo. Además, el uso de ésta planta no sólo se limita al medicinal, sino que es útil también para la buena suerte.

4.8 Compuestos químicos de las plantas

Las plantas elaboran una variedad muy amplia de compuestos químicos que a menudo reciben el nombre de fitoquímicos. Estas sustancias tienen como función alimentar, proteger o estimular el crecimiento de las plantas (Kaufman y col., 1999).

4.8.1 Lípidos

Los lípidos constituyen una heterogénea colección de moléculas, están unidos por una única característica que es la insolubilidad en agua. De los diversos tipos de lípidos presentes en las estructuras biológicas sólo dos tienen gran importancia: los esteroides y los fosfolípidos. El esteroide más importante estructuralmente es el colesterol (Smith, 1975). Los esteroides son sustancias ampliamente distribuidas tanto en el reino animal como el vegetal, son compuestos orgánicos, donde el ejemplo típico es el colesterol, el cual también lo podemos encontrar en las plantas y es el precursor de los

demás esteroides. Aquí podemos mencionar a las saponinas y sapogeninas esteroidales que son sustancias con propiedades de jabón, y se encuentran en las plantas unidas a uno o varios azúcares (Romo de Vivar, 1985).

Dentro de los lípidos se encuentra otro grupo de sustancias químicas de gran interés, que son los terpenoides, los cuales se aíslan frecuentemente en forma de aceites esenciales y se dividen en cinco grupos de acuerdo a las unidades de isopreno que contengan: monoterpenos (2), sesquiterpenos (3), diterpenos (4), triterpenos (6), politerpenos (n). Todos estos compuestos son metabolitos secundarios de plantas. Dentro de estos compuestos destacan las lactonas sesquiterpénicas ó sesquiterpenlactonas ya que tienen propiedades químicas y biológicas interesantes, destacándose la función de hormonas vegetales (Romo de Vivar, 1985).

Tanto las grasas como los aceites, desde el punto de vista químico son ésteres de ácidos grasos y glicerol. Se les llama aceites si son líquidos y grasas si son sólidos (Burton y Routh, 1977). Son sustancias muy comunes a todas las plantas. La gobernadora, contiene gran cantidad de una cera de la cual se ha aislado un antioxidante, el ácido nordihidroguayarético (Domínguez, 1973). Otras sustancias muy comunes en las plantas son las ceras. Las ceras son lípidos simples, ésteres de ácidos grasos y alcoholes de peso molecular elevado (Burton y Routh, 1977).

4.8.2 Compuestos aromáticos

Prácticamente todas las plantas contienen una variedad de productos naturales que incluyen un anillo aromático. Dentro de los compuestos aromáticos fenólicos se encuentran los fenilpropanoides, flavonoides, taninos y quinonas que son fenoles simples, que se encuentran comúnmente formando parte de los tejidos. También están los compuestos aromáticos fenólicos en su forma de ésteres metílicos y el ejemplo más común en las plantas son las coumarinas (Murphy, 1999). Como ejemplo de los fenilpropanoides se encuentran las hidroxicoumarinas, fenilpropanos y lignanos. Dentro los flavonoides tenemos a las catequinas, leucoantocianidinas, flavanonas, flaonas, antocianinas, flavonoles, charconas, auronas e isoflavones. Y como ejemplos

de quinonas podemos mencionar tres principalmente: la benzoquinona, naftoquinona y antroquinona (Kaufman y col., 1999). Por otro lado están los compuestos aromáticos no fenólicos, un ejemplo de estos compuestos son los tetrapirroles, donde se incluyen la clorofila, ficoeritrina, ficocianina, y otros compuestos que son pigmentos de las plantas (Murphy, 1999).

4.8.3 Aminas

Dentro de los compuestos de las plantas están las aminas. El grupo de las aminas se divide en aminas alifáticas que son compuestos que tienen olores muy fuertes y desagradables que poseen algunas plantas para atraer a insectos, y las aminas aromáticas, que destacan por sus propiedades fisiológicas ya que aquí se encuentran los alcaloides (Kaufman y col., 1999). Para obtener compuestos activos de plantas, se utilizan diferentes solventes con diversos grados de polaridad, principalmente se usa agua, etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona. En la (Tabla I) se enlistan los principales compuestos activos de plantas que se obtienen dependiendo el solvente utilizado.

Tabla I. Compuestos activos de plantas y solventes

AGUA	ETANOL	METANOL	CLOROFORMO
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides
*Polisacáridos	Polifenoles	Terpenos	Flavonoides
Taninos	*Poliacetilenos	Saponinas	
Saponinas	Flavonoles	Taninos	
Terpenos	Terpenoides	*Xantocianinas	
*Polipéptidos	*Esteroles	*Totaroles	
*Lectinas	Alcaloides	*Quassinoides	

	*Propolios	*Lactonas	
		Flaonas	
		*Penonas	
		Polifenoles	

ÉTER	ACETONA
Alcaloides	Flavonoides
Terpenoides	

4.8.4. Grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas

Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios (Schultes, 1978). Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos. Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol, y sus derivados. Los principales grupos de compuestos generados por plantas (Tabla II).

Tabla II. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Staphylococcus aureus
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	Salmonella

Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	HIV
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
Cumarinas		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus	
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella, Vibrio, S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylon coca</i> (coca)	Cocos Gram positivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, Lactobacillus
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Protocolo de Investigación

Para el cumplimiento de los objetivos se realizó la estrategia experimental que se resume en la Figura. 7.

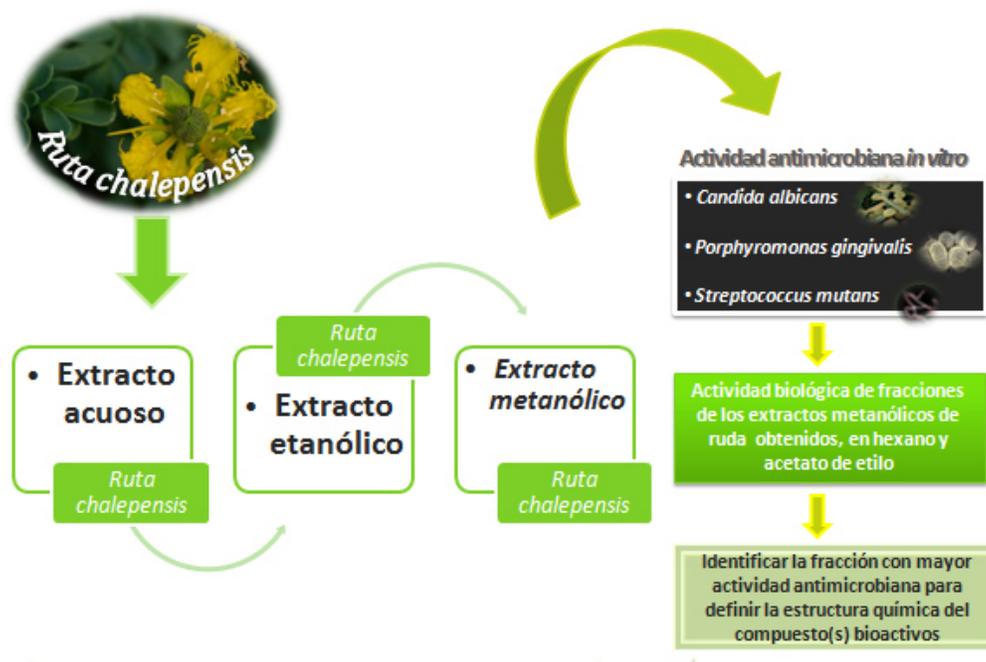


Figura 7. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

5.2 Colecta de material vegetal.

La adquisición del material vegetal se logró colectando en el municipio de Aramberri en el Estado de Nuevo León. Posterior a la colecta del material vegetal, se preparó una muestra para herbario, tomando en cuenta que la muestra tuviera flor, hoja y tallo. Las muestras fueron identificadas y depositadas en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Tabla III).

Tabla III. Clasificación taxonómica de *Ruta chalepensis*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	Ruta
Especie	chalepensis

5.3 Preparación del material vegetal

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron hojas de *R. chalepensis*. Una vez que se realizó la colecta y la identificación del material vegetal se procedió a secar las plantas. Se separó el material en hojas y tallos y se extendió sobre mesas para un secado más homogéneo, aplicando calor producido por focos de halógeno de 90 watts para obtener una temperatura constante de 30°C. Al terminar el secado del material vegetal se procedió a moler el material vegetal utilizando un molino manual.

5.4 Reactivos y medios de cultivo.

La solución de penicilina, fungizona y clorhexidina se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El metanol, buffer de lisis, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), filtros millipore de 0.22µm se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El medio YMB (Yeast Medium Broth), ICC (Infusión cerebro corazón), placas agar sangre y GasPak™ EZ Anaerobe Container System se obtuvieron de CTR Scientific (Monterrey, N. L.) Los aislados clínicos de las cepas *S. mutans*, *P. gingivalis*

C. albicans se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection) (Rockville, MD).

5.5 Preparación de extractos metanólicos

Se tomaron 5g del pulverizado en una tela tipo gasa, se formó un saco el cual se colocó en un vaso de precipitado con 80mL de metanol absoluto, sujetándolo a éste por medio de un clip, se tapó con parafilm, para evitar que se evapore el metanol, y se dejó en agitación durante 24h a temperatura ambiente sobre una base magnética (Corning Stirrer). Se colocaron 1mL de lo extraído en tubos Eppendorf® previamente pesados y fueron secados al vacío por medio de concentrador de vacío (Thermo Electron Co Milford, MA.), se pesaron de nuevo los Eppendorf®, para obtener el peso seco, el extracto seco se disolvió en solución salina 0.85%, medio YM y caldo ICC, dependiendo el tipo de ensayo que se realice, se ajustó a 1mg/mL y se esterilizaron por filtración (Figura 8)

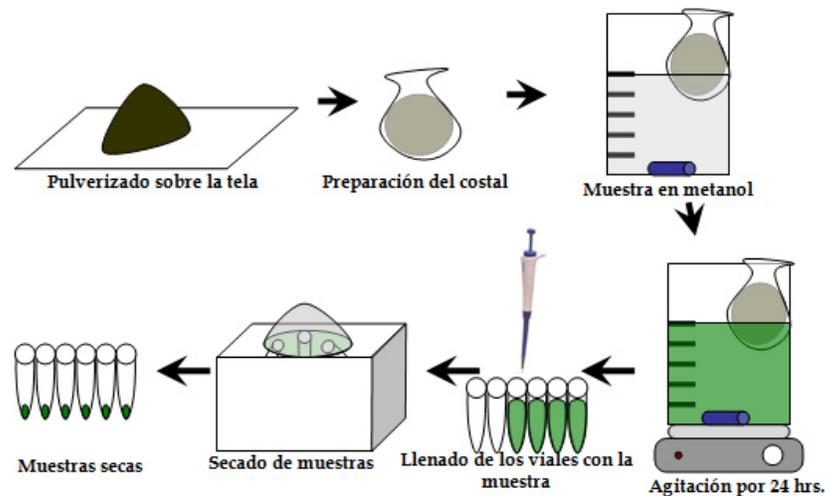


Figura 8. Preparación de extractos metanólicos

5.6 Preparación de extractos etanólicos

Se tomaron 5g del pulverizado en una tela tipo gasa, se formó un saco el cual se colocó en un vaso de precipitado con 80mL de etanol absoluto, sujetándolo a éste por medio de un clip, se tapó con parafilm, para evitar que se evapore el etanol, y se dejó en agitación durante 24h a temperatura ambiente sobre una base magnética (Corning Stirrer). Se colocaron 1mL de lo extraído en tubos Eppendorf® previamente pesados y fueron secados al vacío por medio de concentrador de vacío (Thermo Electron Co Milford, MA.), se pesaron de nuevo los Eppendorf®, para obtener el peso seco, el extracto seco se disolvió en solución salina 0.85%, medio YM y caldo ICC, dependiendo el tipo de ensayo que se realice, se ajustó a 1mg/mL y se esterilizó por filtración (Figura 9).

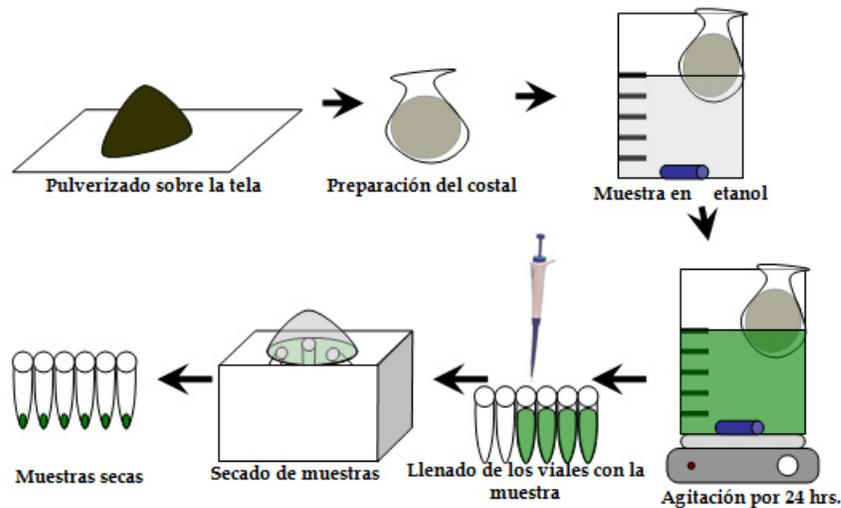


Figura 9. Preparación de extractos etanólicos

5.7 Preparación de extractos acuosos

Se tomaron 5g del pulverizado, que fueron vertidos sobre 80mL de agua a 100°C en vasos de precipitado, se homogenizó y se dejó reposar 10min tapados con papel aluminio; posteriormente, se filtró para eliminar el pulverizado excesivo, se colocaron alícuotas de 2-3mL del filtrado en viales de vidrio previamente pesados y se almacenaron a -70°C durante 12h para ser liofilizados. Después se pesaron para obtener

peso seco de la muestra, la cual se disolvió en solución salina 0.85%, medio YM y medio ICC, dependiendo el tipo de ensayo que se realice, se ajustaron a 1mg/mL y se esterilizaron por filtración (Figura 10).

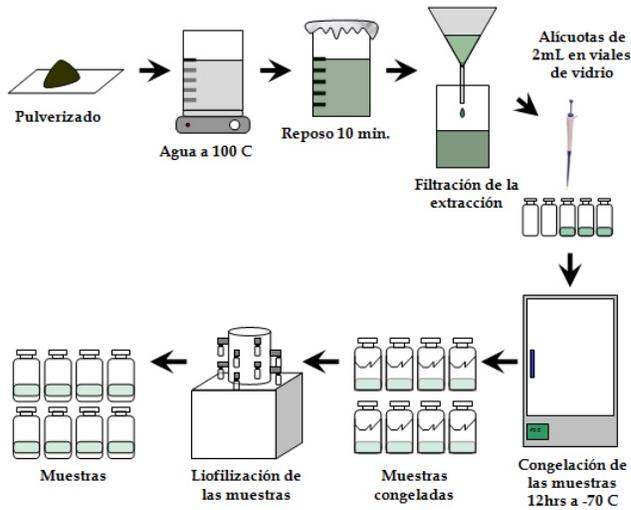


Figura 10. Preparación de extractos acuosos

5.8 Activación de cepas de microorganismos

Del cultivo stock se tomaron 10µL y se inocularon en caldo de cultivo ICC o YM; se incubó por 12h, después de lo cual se preparó el medio al 0.5% de glicerol para su congelación y/o evaluación de actividad antibiótica (Figura 11).

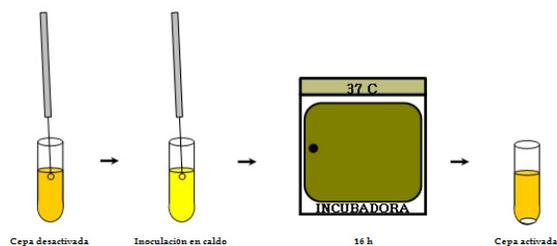


Figura 11. Activación de cepas microbianas

5.9 Preparación de control de vehículo metanólico, etanólico, hexánico y acetato de etilo.

Se colocó una tela tipo gasa y se formó un saco el cual se colocó en un vaso de precipitado con 80 mL sujetándolo a éste por medio de un clip, se tapó con parafilm, para evitar que se evapore el solvente, y se dejó en agitación durante 24h a temperatura ambiente sobre una base magnética (Corning Stirrer). Se colocó 1mL de lo extraído en tubos Eppendorf® previamente pesados y fueron secados al vacío por medio de concentrador de vacío (Thermo Electron Co Milford, MA.), se pesaron de nuevo los Eppendorf®, para obtener el peso seco, se disolvió en solución salina 0.85%, medio YM y caldo ICC, dependiendo el tipo de ensayo que se realice, se ajustó a 1mg/mL.

5.10 Efecto antibacteriano de *R. chalepensis* contra *S. mutans* y *P. gingivalis* por el método de reducción del MTT

Se realizaron diluciones seriadas 1:2 del extracto a partir de 1mg/mL en caldo ICC para *S. mutans* y *P. gingivalis*, sobre placas de 96 pozos de fondo plano (COSTAR, Corning Inc., NY), ajustando un volumen de 50µL, los controles fueron medio ICC (como control negativo), bacterias, y bacterias + antibiótico (tetraciclina 3mg/mL para *S. mutans* y clorhexidina 0.12% mg/mL para *P. gingivalis*). Después se le añadieron 50µL de las bacterias ajustadas a 1×10^3 células/mL, se incubaron 6h para *S. mutans* y 12h para *P. gingivalis*, después de lo cual se les agregaron 15µL de MTT (5mg/mL), se incubaron de 15 a 20min a temperatura ambiente y se agregaron 80µL de DMSO para solubilizar los cristales de formazán. Posteriormente, se leyeron las densidades ópticas a 570nm en un lector de microplacas (Multimode Detection Software DTX 880) (Figura 12).

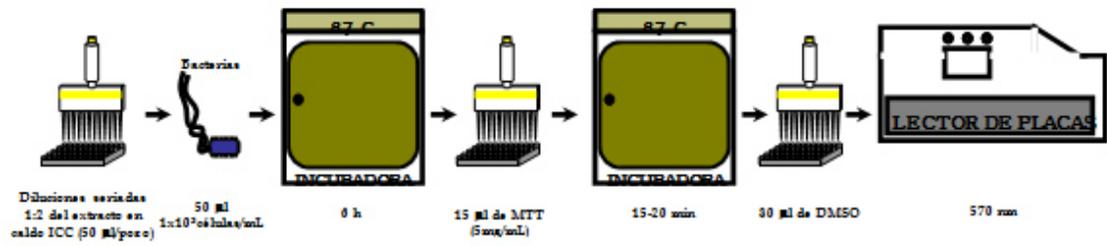


Figura 12. Metodología contra bacterias *in vitro*

5.11 Efecto antifúngico de *R. chalepensis* contra *Candida albicans* por el método de reducción del MTT

Para medirlo, se realizaron diluciones seriadas 1:2 del extracto a partir de 1mg/mL en caldo YM, sobre placas de 96 pozos de fondo plano, ajustando un volumen de 50µL, los controles fueron medio YM, levaduras, y levaduras + antifúngico (fungizona a 3µg/mL). Después se le añadieron 50µL de las levaduras ajustadas a 1x10³ células/mL, se incubaron por 16h, después de lo cual se le agregaron 25µL de MTT (5mg/mL), se incubaron por 3h para posteriormente agregarle 80µL de DMSO. Posteriormente, se leyeron las densidades ópticas a 570nm en un lector de microplacas (Figura 13).

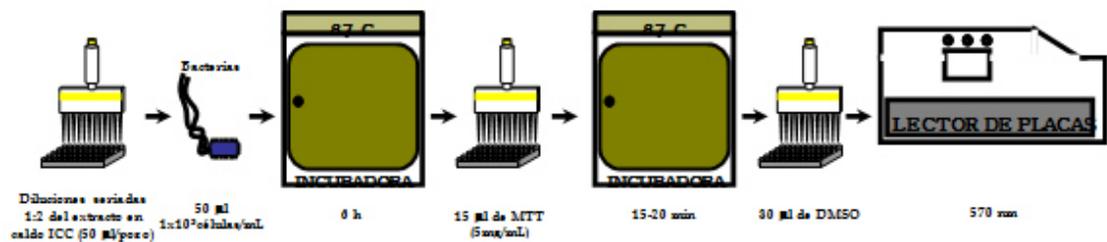


Figura 13. Metodología contra levaduras *in vitro*

5.12 Efecto antimicrobiano de *R. chalepensis* contra *S. mutans*, *P. gingivalis* y *C. albicans* por el método de unidades formadoras de colonias (UFC)

Se preparó una placa de 96 pozos como ya se describió anteriormente. Después se agregó la solución de bacterias e incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 6 o 16h, se realizó una dilución 1:10,000 de cada uno de los pozos. Se tomaron 50µL de cada una de dichas diluciones y se colocaron en una placa de agar previamente identificadas (cepa, tratamiento, concentración y fecha), dispersando el contenido con un asa de dispersión de vidrio, esterilizada a la flama. La mezcla se incubó a 37°C y 5% de CO₂ hasta observar crecimiento macroscópico. Posteriormente se realizó el conteo en un contador de colonias (ULB-100 Lightbox 37864-2000, Scienceware BEL-ART products, Pequannock, NJ) y se realizaron los cálculos necesarios para determinar las UFCs y el porcentaje de inhibición de crecimiento de los microorganismos (Figura 14).

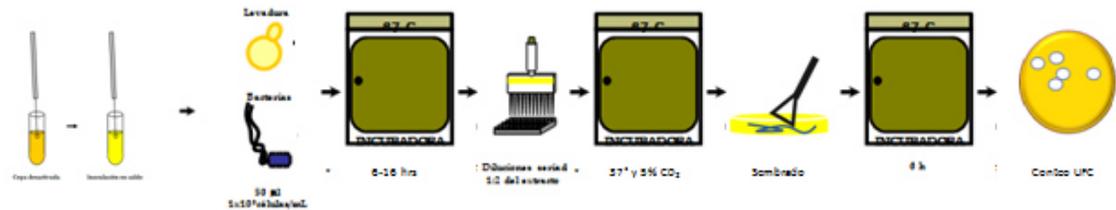


Figura 14. Metodología contra bacterias y levaduras *in vitro*

5.13 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet es un método de extracción líquido-sólido ampliamente utilizado en la extracción de metabolitos de plantas. Este sistema consta de un matraz colector, una cámara de extracción y un condensador (Figura 15). Su principal ventaja es que se trata de un proceso continuo, dado que el solvente deja continuamente el matraz como vapor y es condensado en la cámara de extracción para extraer el material vegetal en forma constante, antes de volver al matraz colector mediante el sistema de sifón. El método es práctico sin embargo presenta la desventaja de que, como requiere calentar el solvente a su punto de ebullición puede causar daño a compuestos termolábiles además de formación de artefactos (Seidel, 2006). Se utilizaron 600 mL (por extractor) de metanol como solvente de extracción, durante 40 h respectivamente. Al finalizar la

extracción se filtró la solución utilizando filtros “Whatman” y mediante el uso de un Rotavapor “Buchi” R-3000 se llevaron a sequedad.



Figura 15. Extractor Soxhlet

5.14 Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana. Cromatografía en columna con sílica de gel

La cromatografía en columna con sílica gel es una técnica que permite la separación de mezclas complejas por medio de la cromatografía por adsorción. Para el desarrollo del proceso cromatográfico es necesario tomar en cuenta la relación que hay entre la fase estacionaria (sílica gel) y la fase móvil para lograr una separación exitosa debido a que esta metodología de separación se lleva a cabo en base al grado de retención que existe entre el analito con la fase estacionaria por medio de puentes de hidrógeno los cuales son formados por los grupos funcionales de las moléculas a separar con los grupos hidroxilos de las partículas de la sílica. Además de la influencia de la fase estacionaria sólida, el grado de afinidad de los compuestos a la fase móvil también juega un rol importante en el fraccionamiento del extracto orgánico, de esta forma es posible obtener primeramente los compuestos con poca afinidad a la fase estacionaria los cuales generalmente son de baja polaridad y finalmente obtener los compuestos de una polaridad mayor (Canell, 1998; Colegate and Molyneus, 2008).

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon dos tamaños distintos de columnas de vidrio: una de 160 cm de largo por 2.5 cm de diámetro empleada para cantidades de muestra que oscilan entre 3 y 10 g y una segunda de 40 cm de largo por 2 cm de diámetro para muestras menores a 2 g. Como fase estacionaria se utilizó Sílica gel “J. T. Baker” de 60-200 mallas usando hasta 200 g para la columna de mayor longitud y 22 g para la segunda (Figura 16). Como fase móvil se emplearon los siguientes solventes orgánicos: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, con los gradientes de elución que se indican en la sección de resultados.



Figura 16. Componentes de columna cromatográfica de 160cm de longitud (Sílica fase normal)

5.15 Cromatografía en columna con sílica gel fase reversa

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad, al igual que con la sílica de fase normal. El principio de la cromatografía en fase reversa es por lo tanto semejante al de la cromatografía en fase normal, sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar y la retención de los compuestos en la fase estacionaria se dará en forma inversa al caso de la sílica de fase normal, es decir los compuestos con

grupos funcionales polares serán eluidos primero y compuestos poco polares como los hidrocarburos serán retenidos más fuerte por la afinidad con la fase estacionaria. Para este tipo de cromatografía se emplean eluentes polares como el metanol (Reid y Sarker, 2006). Se colocaron 20 g de sílica gel en fase reversa C-18 “Waters Associates Inc.” suspendidos en 40 mL de metanol en una columna de 40 cm de largo y 2 cm de diámetro y se eluyó con metanol. Las fracciones colectadas fueron de 2 o 2.5 mL (Figura 17).



Figura 17. Componentes de la cromatografía en columna en fase reversa C₁₈

5.16 Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso o tamaño molecular. En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta (Reid y Sarker, 2006).

El polímero utilizado en ésta investigación fue Sephadex LH-20 25-100 μm , el cual fue preparado mediante la hidroxipropilación de Sephadex G-25, para la separación de

productos naturales como esteroides, terpenoides y lípidos en solventes orgánicos (Ellingboe y col., 1970).

Para la realización de esta técnica cromatográfica se empleó una columna de 160 cm de largo por 1.5 cm de diámetro y un aproximado de 50 g de Sephadex LH-20 como matriz cromatográfica, la cual se suspendió en 150 ml de metanol. Para su elución se empleó metanol y se colectaron fracciones de un volumen aproximado de 5 ml hasta completar la elución total de la muestra (Figura 18).

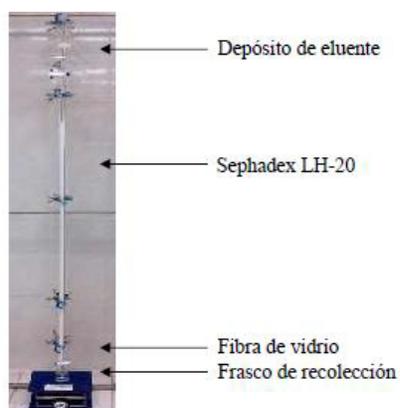


Figura 18. Cromatografía en columna de exclusión Sephadex LH-20

5.17 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es una técnica cualitativa que permite constatar la pureza de los componentes del extracto separados mediante la cromatografía en columna. Ésta consiste de una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica gel, la cual está mezclada con sulfato de calcio como fraguante. La mezcla a separar, disuelta en una pequeña cantidad de solvente, se coloca mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatoplaca. Ésta se introduce a continuación en una cámara cromatográfica la cual contiene una cierta cantidad de la fase móvil (eluente). El eluente sube por capilaridad a través de la cromatoplaca lográndose la separación de los componentes de la mezcla en base al equilibrio (Dzido y Tuzimski, 2008) entre la adsorción de los componentes sobre la sílica y la solución de los mismos en el eluente (Figura 19).



Figura 19. Desarrollo de una CCF dentro de una cámara cromatográfica

Una vez terminado el proceso de separación, la cromatoplaca se revela mediante una lámpara de luz ultravioleta (254 nm) o utilizando una cámara de yodo, con ambos métodos se observan como manchas los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplaca (Figura 20). Para nuestra investigación se utilizaron cromatoplacas “Merck” (Silica gel 60 F254, 5 ×10 cm y 4 x 8 cm, 250 µm de grosor de capa) y los extractos y fracciones analizadas se colocaron utilizando un capilar de vidrio (Figura 20).

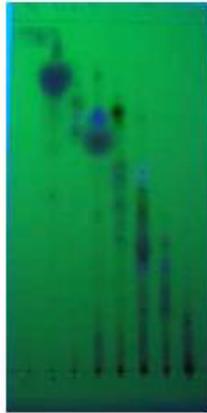


Figura 20. Cromatografía en Capa Delgada bajo luz UV (254 nm)

5.18 Análisis espectroscópico. Resonancia Magnética Nuclear.

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ha sido el más importante método físico para la determinación de estructuras moleculares por más de 40 años. Los alcances de esta técnica no sólo permiten conocer el tipo de átomos en la molécula, sino que también describe el ambiente químico de cada uno de estos y lo más importante, la forma en que están interconectados. Básicamente, se trata de otra forma de espectroscopia de absorción, debido a que cuando una muestra es mantenida en un campo magnético los números del spin que son diferentes a cero son capaces de absorber energía del espectro electromagnético del rango de las radiofrecuencias (60-600 MHz). En el estudio de los productos naturales los átomos que realmente toman importancia para esta técnica son ^1H y ^{13}C . Los espectros de RMN se obtienen normalmente en soluciones del 2 al 30 %, en un disolvente aprótico (normalmente cloroformo deuterado, tetracloruro de carbono o sulfóxido de dimetilo) y un pequeño porcentaje del estándar de referencia tetrametilsilano (Silverstein y col., 2005; Colegate y col., 2008) ver figura 21. Para nuestras investigaciones los espectros de RMN fueron obtenidos con un instrumento Bruker DPX (^1H , 300 o 400 MHz; ^{13}C , 100 o 125 MHz).

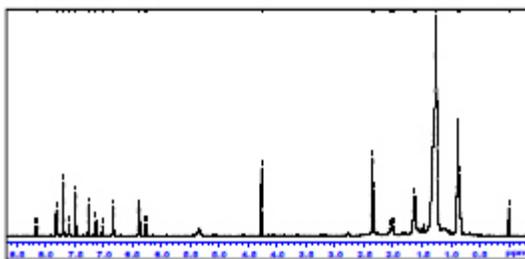


Figura 21. Espectro de ^1H -RMN

5.19 Espectrometría de masas

El principio de la Espectrometría de Masas es generar iones de compuestos orgánicos por diferentes métodos y separar sus iones en base a su relación de masa/carga (m/z). Comúnmente se utilizan el método de ionización de electro impacto (EI), donde se bombardea las moléculas en fase de vapor con electrones de alta energía y posteriormente registrando los resultados en un espectro de iones positivos, los cuales han sido separados en base a m/z (Silverstein y col., 2005). El uso de esta técnica se ha

extendido ampliamente en la determinación estructural de los productos naturales debido a su gran sensibilidad permitiéndonos conocer datos cualitativos y cuantitativos de los compuestos que conforman un extracto orgánico. Un estudio detallado de los espectros mediante el análisis del espectro puede obtenerse la fórmula molecular del compuesto, sin embargo la interpretación es más compleja comparada con RMN y la información de conectividad (importante para la determinación de la estructura) sólo puede obtenerse indirectamente a través de revisión

cuidadosa de los fragmentos graficados en el espectro (Gross, 2004). Para nuestras investigaciones se utilizó un instrumento Bruker FTICR 4.7 T para espectros por electrospray y de alta resolución (ESI-HR) (Figura 22).

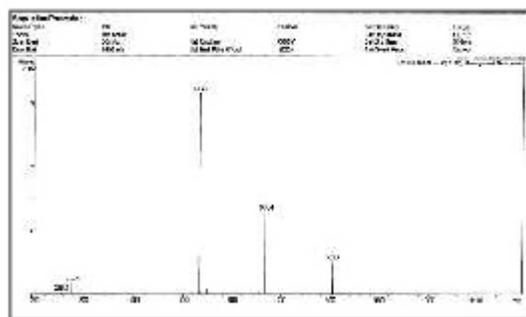


Figura 22. Espectro de (+) –ESI-MS

5.20 Determinación de punto de fusión

El punto de fusión de un sólido, se define como la temperatura a la cual, a una temperatura dada, las fases sólidas y líquidas están en equilibrio. Ésta característica física se reporta como un intervalo de tiempo, es decir la temperatura a la cual se empieza a observar el primer indicio de fusión y la temperatura a la cual desaparece el último cristal. Por lo que la temperatura, como el intervalo de temperaturas de un punto de fusión observado son datos importantes que reflejan la pureza de una muestra, ya que el intervalo del punto de fusión debe disminuir y el punto de fusión debe aumentar, en tanto se van eliminando las impurezas en las sucesivas etapas de purificación. Para la lectura del punto de fusión se empleó un equipo Electrothermal 9100 (Electrothermal Engineering Ltd., Southend on Sea, Essex, UK) y se usaron capilares sellados en los

cuales se depositó la muestra para ser evaluada. Cada una de las lecturas se realizó por triplicado.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media de triplicados por tratamiento de al menos tres experimentos independientes. El nivel de significancia de la diferencia entre los tratamientos se evaluó mediante la prueba de t de Student y el análisis de varianza (ANOVA). En aquellos resultados que se presentaban más de tres variables se utilizó un ANOVA y como post estadístico la prueba de corrección de Bonferroni. Y en los casos en donde solo se compararon dos variables se utilizó la prueba de t student y como prueba complementaria U Mann-Whitney. Todos los experimentos se corrieron de forma independiente y con tres réplicas.

7. RESULTADOS

7.1 Colecta e identificación de *R. chalepensis*.

La colecta de la planta *R. chalepensis* se realizó en el municipio de Aramberri (Estado de Nuevo León, México). La identificación del espécimen vegetal se llevó a cabo por personal del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y fueron depositadas las muestras correspondientes en el herbario de la misma (Tabla IV).

Tabla IV. Características del material vegetal. AR, Aramberri.

Planta	No. de Voucher	Parte colectada	Lugar de colecta (coordenadas)
<i>Ruta chalepensis</i>	025579	Hoja	AR:29°19'12.10'' 99°54'54.49''

7.2 Análisis de la actividad del control de vehículo metanólico, etanólico, hexano y acetato de etilo *in vitro* contra *S. mutans*.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que los solventes no mostraron tener efecto antibacteriano contra *S. mutans*.

7.3 Análisis de la actividad del control de vehículo metanólico, etanólico, hexano y acetato de etilo *in vitro* contra *P. gingivalis*.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que los solventes no mostraron tener efecto antibacteriano contra *P. gingivalis*.

7.4 Análisis de la actividad del control de vehículo metanólico, etanólico, hexano y acetato de etilo *in vitro* contra *C. albicans*.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que los solventes no mostraron tener efecto antibacteriano contra *C. albicans*.

7.2 Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis in vitro* contra de *S. mutans*.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis* contra *S. mutans* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual el microorganismo se sometió a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.2.1 Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis in vitro* contra *S. mutans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que el extracto metanólico de la hoja de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano significativo de 63% ($p < 0.001$) a una concentración de 500µg/mL y de 13.58% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81µg/mL ($p < 0.05$) (Tabla V). El extracto acuoso mostró una actividad de proliferación sobre *S. mutans* a partir de una concentración de 15.6 µg/mL ($p < 0.05$), en donde la concentración de 125 µg/mL ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla VI). El extracto etanólico mostró actividad de proliferación sobre *S. mutans* a partir de una concentración de 7.81µg/mL ($p < 0.01$), en donde la concentración de 31.2 µg/mL ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla VII).

Tabla V. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Ruta chalepensis* in vitro contra *Streptococcus mutans*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
	Media	± Error	Media	± Error	Media	± Error	
Control^c	0.540	± 0.028	0.648	± 0.008	0.697	± 0.085	0%
7.81	0.409	± 0.016	0.617	± 0.020	0.813	± 0.173	13.58%*
15.6	0.414	± 0.030	0.668	± 0.011	0.893	± 0.210	8.96%*
31.2	0.416	± 0.030	0.653	± 0.024	0.785	± 0.162	9.97%*
62.5	0.440	± 0.014	0.555	± 0.137	0.744	± 0.139	16.21%*
125	0.347	± 0.014	0.607	± 0.143	0.707	± 0.177	19.78%*
250	0.275	± 0.034	0.487	± 0.127	0.559	± 0.129	35.85%**
500	0.195	± 0.010	0.241	± 0.007	0.297	± 0.023	63.26%***

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla VI. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Ruta chalepensis* in vitro sobre la proliferación de *Streptococcus mutans*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
	Media	± Error	Media	± Error	Media	± Error	
Control^c	0.081	± 0.013	0.272	± 0.086	0.211	± 0.08	-
7.81	0.298	± 0.009	0.338	± 0.017	0.310	± 0.035	1.677
15.6	0.241	± 0.028	0.336	± 0.023	0.288	± 0.035	1.533*
31.2	0.398	± 0.038	0.355	± 0.035	0.286	± 0.016	1.842

62.5	0.264	± 0.011	0.392	± 0.052	0.289	± 0.015	1.675*
125	0.285	± 0.015	0.395	± 0.019	0.330	± 0.008	1.790**
250	0.448	± 0.073	0.398	± 0.019	0.269	± 0.052	1.976
500	0.626	± 0.044	0.644	± 0.008	0.320	± 0.026	2.819
<p>^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. *$p < 0.05$, **$p \leq .01$ ***$p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.</p>							

Tabla VII. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Ruta chalepensis* in vitro sobre la proliferación de *Streptococcus mutans*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control ^c	0.115	± 0.003	0.097	± 0.003	0.319	± 0.128	-
7.81	0.411	± 0.055	0.375	± 0.055	0.470	± 0.037	2.365**
15.6	0.362	± 0.043	0.447	± 0.058	0.578	± 0.089	2.612**
31.2	0.375	± 0.034	0.442	± 0.015	0.578	± 0.087	2.627**
62.5	0.272	± 0.016	0.593	± 0.048	0.426	± 0.085	2.431
125	0.189	± 0.022	0.467	± 0.021	0.348	± 0.036	1.890
250	0.164	± 0.004	0.386	± 0.028	0.311	± 0.051	1.621
500	0.140	± 0.000	0.159	± 0.003	0.141	± 0.008	0.828
<p>^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. *$p < 0.05$, **$p \leq .01$ ***$p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.</p>							

7.2.2 Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis* *in vitro* contra *S. mutans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados por el método de UFC, se observó que el extracto metanólico del material vegetal de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano significativo de 92% ($p<0.01$) a una concentración de 500 μ g/mL y de 58% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 μ g/mL ($p<0.05$) (Tabla VIII). El extracto acuoso mostró una actividad de proliferación sobre *S. mutans* a partir de una concentración de 7.81 μ g/mL ($p<0.01$), en donde la concentración de 250 μ g/mL ($p<0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla IX). El extracto etanólico mostró actividad de proliferación sobre *S. mutans* a partir de una concentración de 7.81 μ g/mL ($p<0.05$), en donde la concentración de 500 μ g/mL ($p<0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla X).

Tabla VIII. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>Ruta chalepensis</i> <i>in vitro</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> . (Método UFC)							
Concentración (μ g/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
Control ^c	173	\pm 136.76	145	\pm 0.003	114	\pm 0.128	0%
7.81	307	\pm 33.17	128	\pm 0.055	325	\pm 0.037	58%*
15.6	168	\pm 68.96	105	\pm 0.058	321	\pm 0.089	64%*
31.2	370	\pm 11.78	350	\pm 0.015	327	\pm 0.087	83%*
62.5	442	\pm 202.68	410	\pm 0.048	94	\pm 0.085	78%**
125	181	\pm 131.41	336	\pm 0.021	67	\pm 0.036	86%**
250	85	\pm 27.47	104	\pm 0.028	71	\pm 0.051	93%**
500	138	\pm 51.24	118	\pm 0.003	48	\pm 0.008	92%**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. **p* < 0.05, ***p* ≤ .01 ****p* ≤ .001 comparado con el control sin tratar.

Tabla IX. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Ruta chalepensis* *in vitro* sobre la proliferación de *Streptococcus mutans*. (Método UFC)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	1899.33	± 83.435	3843.3	± 89.856	3339	± 68.57	-
7.81	2618.66	± 152.36	4473.6	± 74.04	3731.6	± 33.33	1.191**
15.6	2515	± 166.86	4448	± 164.38	3787	± 61.43	1.183**
31.2	2299.66	± 448.82	4439	± 71.51	3748.3	± 30.33	1.154**
62.5	2240.33	± 43.028	4530	± 94.48	3845.3	± 40.71	1.168**
125	2211.33	± 67.107	4518	± 158.34	3810.6	± 21.66	0.940*
250	2230	± 69.159	4486	± 131.63	3857.6	± 76.87	1.164**
500	2187.66	± 109.93	4662	± 192.42	3935	± 26.35	1.187*

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. **p* < 0.05, ***p* ≤ .01 ****p* ≤ .001 comparado con el control sin tratar.

Tabla X. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro sobre la proliferación de <i>Streptococcus mutans</i>. (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación^b
Control ^c	1370	± 54.00	1837.6	± 81.39	1603.3	± 121.02	-
7.81	1742	± 187.53	2237.3	± 226.91	1767.3	± 77.833	1.194*
15.6	1555.33	± 236.71	2103	± 142.47	1899.3	± 131.00	1.155*
31.2	1604	± 97.89	2496	± 170.14	1796.3	± 108.95	1.225
62.5	1620.66	± 186.32	2619	± 126.02	1781	± 121.30	1.251*
125	1867.33	± 62.07	2534	± 280.09	1724	± 155.01	1.273
250	1749.33	± 58.31	2241	± 173.49	1984	± 74.505	1.241***
500	1936.66	± 45.90	2196	± 137.76	2093	± 68.573	1.294**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.3 Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis* in vitro contra de *P. gingivalis*.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis* contra *P.gingivalis* se empleó el método colorimétrico de

MTT, en el cual el microorganismo se sometió a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.3.1 Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis in vitro* en contra de *P. gingivalis* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que el extracto metanólico de la hoja de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano de 24.8% ($p < 0.05$) a una concentración de 500µg/mL y de 12.7% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81µg/mL ($p < 0.001$) (Tabla XI). El extracto acuoso mostró una actividad de proliferación sobre *P. gingivalis* a partir de una concentración de 7.81 µg/mL ($p < 0.001$), en donde la concentración de 250 µg/mL ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XII). El extracto etanólico mostró actividad de proliferación sobre *P.gingivalis* a partir de una concentración de 7.81µg/mL ($p < 0.01$), en donde la concentración de 15.6 µg/mL ($p < 0.001$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XIII).

Tabla XI. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Ruta chalepensis in vitro* contra *Porphyromonas gingivalis*.(Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
Control^c	1.395	± 0.054	1.27	± 0.125	1.027	± 0.011	0%
7.81	1.212	± 0.039	1.113	± 0.189	0.850	± 0.133	12.7%***
15.6	1.254	± 0.030	1.122	± 0.137	0.933	± 0.130	10.8%**
31.2	1.165	± 0.091	1.182	± 0.118	0.895	± 0.056	11.9%*

62.5	1.146	± 0.092	1.103	± 0.121	0.998	± 0.023	15.5%
125	1.176	± 0.158	1.147	± 0.135	0.995	± 0.177	12.8%
250	1.213	± 0.200	1.094	± 0.182	0.955	± 0.117	13.4%*
500	1.002	± 0.225	1.001	± 0.286	0.953	± 0.311	24.8%*

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XII. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Ruta chalepensis* *in vitro* sobre la proliferación de *Porphyromonas gingivalis*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	0.103	± 0.003	0.145	± 0.006	0.129	± 0.004	-
7.81	1.804	± 0.028	2.175	± 0.535	2.069	± 0.618	16.128***
15.6	1.765	± 0.314	2.329	± 0.111	2.033	± 0.069	16.338
31.2	1.302	± 0.108	1.898	± 0.218	2.062	± 0.093	14.032
62.5	1.839	± 0.377	2.151	± 0.282	2.242	± 0.051	16.618***
125	1.415	± 0.141	2.731	± 0.332	2.264	± 0.109	17.09**
250	1.397	± 0.035	2.479	± 0.285	2.265	± 0.124	16.376**
500	0.626	± 0.044	0.644	± 0.008	2.742	± 0.320	10.698

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la

media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XIII. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Ruta chalepensis in vitro* sobre la proliferación de *Porphyromonas gingivalis*. (Método MTT)

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	0.095	± 0.002	0.098	± 0.002	0.117	± 0.004	-
7.81	1.869	± 0.059	2.313	± 0.077	1.364	± 0.165	17.948**
15.6	1.927	± 0.096	2.305	± 0.079	1.384	± 0.098	18.174***
31.2	1.636	± 0.020	2.135	± 0.192	1.405	± 0.099	16.750
62.5	1.784	± 0.171	2.173	± 0.145	1.537	± 0.032	17.779
125	1.625	± 0.178	2.066	± 0.067	1.417	± 0.091	16.530
250	1.736	± 0.115	2.435	± 0.068	1.86	± 0.261	19.571
500	2.292	± 0.085	2.735	± 0.069	1.908	± 0.362	22.443

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.3.2 Análisis de la actividad antibacteriana de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis in vitro* en contra de *P. gingivalis* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo mediante UFC, se observó que el extracto metanólico de la hoja de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano de 46.09% ($p < 0.001$) a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 21.04% a una concentración mínima inhibitoria de 15.6 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$) (Tabla XIV). El extracto acuoso mostró un

efecto antibacteriano de 16.20% ($p < 0.001$) a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 9.85% ($p < 0.05$) a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla XV), mientras que el extracto etanólico mostró un efecto antibacteriano de 28.47% ($p < 0.01$) a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 17.70% ($p < 0.01$) a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla XVI).

Tabla XIV. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Ruta chalepensis in vitro* contra *Porphyromonas gingivalis*. (Método UFC)

Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
Control ^c	354	± 13.203	392.33	± 32.849	332.66	± 51.466	0%
7.81	342.66	± 10.268	346.66	± 12.914	281.66	± 43.225	15.33%
15.6	282	± 9.273	221	± 68.339	262.66	± 45.732	21.04%*
31.2	287.66	± 14.858	268	± 31.480	292.33	± 49.242	12.12%**
62.5	174.33	± 37.230	305	± 29.737	276	± 44.710	17.034%
125	276.66	± 47.893	250.33	± 64.405	226.33	± 25.860	31.96%*
250	222.66	± 29.356	240.66	± 63.619	207.66	± 16.024	37.57%***
500	173	± 13.868	141.66	± 12.128	179.33	± 17.188	46.09%***

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control, por lo tanto es igual a 0. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XV. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro contra <i>Porphyromonas gingivalis</i>. (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
Control ^c	400	± 1.632	300.5	± 2.041	338.5	± 8.573	0%
7.81	348.5	± 41.233	283	± 22.045	305	± 5.715	9.85%*
15.6	340.5	± 37.967	263	± 3.265	282.5	± 23.270	13.84%**
31.2	383.5	± 2.041	277.5	± 11.022	295.5	± 7.756	5.63%*
62.5	349	± 29.393	259.5	± 18.371	285.5	± 26.536	13.13%**
125	389	± 11.430	269.5	± 17.554	286	± 6.531	5.99%*
250	344	± 34.292	249	± 12.247	263.5	± 37.150	15.34%**
500	343.5	± 24.903	243.5	± 24.903	261	± 21.228	16.20%**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XVI. Efecto de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Ruta chalepensis* in vitro contra *Porphyrromonas gingivalis*. (Método UFC)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
	Media	± error estándar	Media	± error estándar	Media	± error estándar	
Control^c	436	± 17.058	411.66	± 10.728	374	± 31.342	0%
7.81	361.33	± 17.476	334.33	± 24.888	360	± 33.955	17.70%**
15.6	335	± 7.810	278.33	± 32.001	356	± 21.779	27.18%*
31.2	286.66	± 28.753	242.33	± 24.340	324	± 11.357	36.67%**
62.5	354.66	± 16.424	232	± 39.310	327.33	± 17.333	28.94%
125	328.33	± 10.447	270.66	± 18.853	294.66	± 45.812	25.64%*
250	336.33	± 7.623	262.66	± 23.182	268.33	± 15.025	21.96%
500	254	± 31.432	227.33	± 34.333	242.33	± 8.412	28.47%**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.4 Análisis de la actividad antifúngica de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis* in vitro contra de *C. albicans*.

Para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos metanólico, acuoso y etanólico de *R. chalepensis* contra *C. albicans* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual suspensiones fúngicas se incubaron con soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la viabilidad se determinó mediante la reducción del MTT (5mg/mL) y por el método de unidades formadoras de colonias (UFC), como ya se explicó anteriormente. Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.4.1 Análisis de la actividad antifúngica de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *R. chalepensis* in vitro contra de *C. albicans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que el extracto metanólico de la hoja de *R. chalepensis* mostró un efecto antifúngico contra *C. albicans* de 9.45% ($p < 0.05$) a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 9.37% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$) (Tabla XVII). El extracto acuoso mostró una actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$), en donde la concentración de 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XVIII). El extracto etanólico mostró actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$), en donde la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XIX).

Tabla XVII. Efecto de la actividad antifúngica del extracto metanólico de *Ruta chalepensis* in vitro contra *Candida albicans*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		% de Inhibición ^b
Control^c	0.6906	± 0.0188	0.6526	± 0.0453	0.64	± 0.0494	-
7.81	0.619	± 0.0040	0.0598	± 0.0379	0.5503	± 0.0671	9.37%**
15.6	0.5693	± 0.0198	0.5383	± 0.0271	0.5733	± 0.0556	17.54%**
31.2	0.59	± 0.0302	0.5476	± 0.0441	0.5363	± 0.0538	15.31%
62.5	0.5986	± 0.0852	0.595	± 0.0542	0.5893	± 0.0229	11.14%**
125	0.591	± 0.0605	0.5936	± 0.0571	0.5896	± 0.0517	11.81%*
250	0.635	± 0.0364	0.5956	± 0.0565	0.5966	± 0.0448	8.38%**
500	0.5996	± 0.0634	0.6166	± 0.0609	0.5876	± 0.0415	9.45%*

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XVIII. Efecto de la actividad antifúngica del extracto acuoso de *Ruta chalepensis* in vitro sobre la proliferación de *Candida albicans*. (Método MTT)

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control ^c	0.4076	± 0.0050	0.3985	± 0.0470	0.1848	± 0.0046	-
7.81	0.4854	± 0.0606	0.4351	± 0.0109	0.2610	± 0.0070	1.192**
15.6	0.4032	± 0.0861	0.4523	± 0.0172	0.235	± 0.0102	1.100
31.2	0.5032	± 0.1262	0.4797	± 0.0489	0.227	± 0.0246	1.221*
62.5	0.4606	± 0.0436	0.4155	± 0.1462	0.2252	± 0.0267	1.111**
125	0.5146	± 0.0618	0.5585	± 0.0732	0.1856	± 0.0152	1.270
250	0.4952	± 0.0948	0.5088	± 0.1273	0.1617	± 0.0154	1.176
500	0.5392	± 0.0179	0.5727	± 0.0186	0.1471	± 0.0140	1.270

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XIX. Efecto de la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Ruta chalepensis* in vitro sobre la proliferación de *Candida albicans*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	0.4043	± 0.1262	0.4237	± 0.0734	0.6564	± 0.0135	-
7.81	0.5556	± 0.1238	0.6654	± 0.3258	0.9422	± 0.0756	1.457**
15.6	0.5123	± 0.0800	0.5539	± 0.3013	0.8013	± 0.1458	1.258**
31.2	0.4583	± 0.0744	0.6564	± 0.0714	0.9581	± 0.2573	1.396*
62.5	0.431	± 0.0481	0.6474	± 0.0334	0.8986	± 0.1901	1.331
125	0.455	± 0.0281	0.6349	± 0.0711	0.8192	± 0.1756	1.286*
250	0.4493	± 0.0296	0.5777	± 0.0789	0.7870	± 0.1265	1.222*
500	0.5213	± 0.0449	0.6124	± 0.0736	0.7315	± 0.0481	1.256*

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.4.2 Análisis de la actividad antifúngica de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *R. chalepensis in vitro* en contra de *C. albicans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que el extracto metanólico de la hoja de *R. chalepensis* mostró un efecto antifúngico de 31.36% ($p < 0.05$) a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 16.95% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$) (Tabla XX). El extracto acuoso mostró una actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXI). El extracto etanólico mostró actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.001$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXII).

Tabla XX. Efecto de la actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>Ruta chalepensis</i> contra <i>Candida albicans</i> . (Método UFC)							
Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		% de Inhibición
Control ^c	188.66	± 2.0275	174.3	± 0.8819	179	± 7.637	-
7.81	152	± 21.931	152.6	± 2.6034	153.3	± 6.641	16.95%**
15.6	184.33	± 2.4037	163	± 2.886	156	± 19.697	7.43%
31.2	161	± 11.930	163	± 4.932	150	± 7.234	15.41%*
62.5	160	± 15.947	152.66	± 5.696	141.3	± 25.313	18.04%**
125	156	± 17.502	159.33	± 15.070	158.6	± 9.134	14.41%*
250	152	± 11.590	157.33	± 17.333	150.6	± 25.464	17.67%*
500	127.33	± 3.4801	153	± 8.0829	125	± 16.370	31.36%*

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control, por lo tanto es igual a 0. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XXI. Efecto de la actividad antifúngica del extracto acuoso de <i>Ruta chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>Candida albicans</i>. (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	1483	± 101.60	1600.6	± 97.307	1603.3	± 121.02	-
7.81	1736.66	±42.211	1727.3	± 29.812	1767.3	± 77.833	1.116*
15.6	1595.66	± 80.254	1639.6	± 57.574	1736	± 124.37	1.060*
31.2	1631.66	±95.628	1829.3	± 44.802	1796.3	± 108.95	1.121**
62.5	1835.33	±79.677	1685.6	±41.159	1781	± 121.30	1.131
125	1661.66	± 57.289	1864	± 79.952	1757.3	± 70.536	1.127**
250	1599.66	± 103.62	1671	± 63.579	1743.3	± 51.518	1.069**
500	1719	±86.625	1862.6	± 208.38	2093	± 68.573	1.210*

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

Tabla XXII. Efecto de la actividad antifúngica del extracto etanólico de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro sobre la proliferación de <i>Candida albicans</i>.(Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control ^c	887.66	± 54.228	1232.3	± 66.132	1226.3	± 65.529	-
7.81	953	± 127.81	1363	± 23.713	1271.6	± 33.547	1.072*
15.6	1174.33	± 171.19	1524.6	± 42.431	1328.6	± 53.994	1.203*
31.2	977.66	±128.15	1398	± 43.431	1419	± 39.119	1.134**
62.5	1155.66	±250.63	1330	± 120.06	1319.6	± 38.489	1.137*
125	1268.66	± 189.81	1273.6	± 150.14	1555.3	± 57.158	1.224
250	1091.33	± 59.928	1440	± 57.297	1359	± 62.500	1.162**
500	1120.66	± 40.142	1404	± 20.744	1452.3	± 64.190	1.188**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.5 Fraccionamiento de extractos de *R. chalepensis* y evaluación de su actividad antimicrobiana.

Se realizó una primera extracción de *R. chalepensis* empleando 60 g de material vegetal y 600 ml de metanol como solvente de extracción. La extracción se llevó a cabo empleando un aparato Soxhlet y tuvo una duración de 40 horas. Al término del proceso de extracción y una vez que el solvente alcanzó la temperatura ambiente precipitó un sólido (S1) el cual fue filtrado antes de proceder a la eliminación del metanol por medio de un rotavapor. Posterior a la obtención del extracto crudo metanólico de *R. chalepensis*

y haber determinado los rendimientos totales del extracto (ver tabla XXIII), se realizó una partición con hexano y con acetato de etilo como se describe a continuación.

Tabla XXIII. Peso seco y porcentaje de rendimiento del material vegetal			
Material vegetal	Peso seco del material vegetal (g)	Peso del extracto crudo (g)	Rendimiento (%P/P)
<i>R. chalepensis</i>	32	4.07	12.72

7.5.1 Partición del extracto metanólico I de *R. chalepensis* (Pérez-Castorena y col.,2006).

La totalidad del extracto metanólico de 14.97 g se disolvió en un volumen de 200 ml de metanol para posteriormente se vertió a un embudo de separación de 500 ml. A la solución anterior se le añadieron 200 ml de hexano y se agitó vigorosamente, observándose la formación de un sólido insoluble en las paredes del embudo. Una vez que se formaron las dos fases correspondientes se procedió a separar la fase hexánica (fase superior) de la fase metanólica y por raspado se recuperó el sólido unido a las paredes del embudo (S2). Este proceso se realizó por triplicado.

Ya separadas las fases hexánica y metanólica se procedió a eliminar el solvente de la fase hexánica por medio de una destilación al vacío empleando un rotavapor para así obtener el rendimiento. De la fase metanólica solamente se evaporó el solvente hasta obtener un volumen aproximado de 50 ml, los cuales fueron vertidos gota a gota en un vaso de precipitado de 250 ml conteniendo 150 ml de agua destilada, bajo constante agitación. La solución metanólica-acuosa se transfirió a un embudo de separación de 500 ml y se le añadieron 200 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente y se esperó a que se formaran las fases de acetato de etilo (fase inferior) y la fase metanólica-acuosa para posteriormente separarlas. Esto proceso se realizó por triplicado.

Posterior a la separación de la fase de acetato de etilo y la metanólica-acuosa se evaporó el solvente de la fase de acetato de etilo empleando un rotavapor y se calculó el rendimiento (ver tabla XXIV). La fase metanol-agua se desechó.

Tabla XXIV. Rendimientos de la partición con hexano y acetato de etilo del extracto metanólico I de <i>R. chalepensis</i>	
Extracto I de <i>R. chalepensis</i>	Rendimiento (g)
Extracto metanólico	14.97
Hexánica	1.28
Acetato de etilo	2.58
S1	2.54
S2	3.64

7.6. Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica, de *R. chalepensis in vitro* en contra de *S. mutans* por el método de MTT y UFC.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *R. chalepensis* contra *S. mutans* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual los microorganismos se sometieron a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.6.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *R. chalepensis in vitro* contra de *S. mutans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que la fracción hexánica de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano significativo de 60.51% a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 13.98% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla XXV).

Tabla XXV. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *Ruta chalepensis* in vitro contra *Streptococcus mutans*. (Método MTT)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		% de Inhibición ^b
Control^c	0.50213	± 0.1020	0.7776	± 0.0406	1.9919	± 0.0924	-
7.81	0.35776	± 0.0582	0.743	± 0.0313	1.6954	± 0.0526	13.98%
15.6	0.32473	± 0.0533	0.7329	± 0.0258	1.8532	± 0.0170	17.35%
31.2	0.41993	± 0.0539	0.7163	± 0.0102	1.7670	± 0.0158	11.21%
62.5	0.3801	± 0.0586	0.6732	± 0.0171	1.5517	± 0.0500	17.69%
125	0.2258	± 0.0336	0.6170	± 0.0168	1.2651	± 0.0557	34.14%
250	0.22543	± 0.0266	0.5218	± 0.0451	1.0362	± 0.0476	41.60%
500	0.18543	± 0.0097	0.3198	± 0.0154	0.6205	± 0.0401	60.51%

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. **p* < 0.05, ***p* ≤ .01 ****p* ≤ .001 comparado con el control sin tratar.

7.6.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *R. chalepensis* in vitro contra de *S. mutans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo mediante UFC, se observó que la fracción hexánica de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano significativo de 39.12% (*p*<0.01) a una concentración de 500µg/mL y de 32.28% a una concentración mínima inhibitoria de 7.8µg/mL (*p*<0.01) (Tabla XXVI).

Tabla XXVI. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro contra <i>Streptococcus mutans</i> . (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		% de Inhibición ^b
Control^c	156	± 15.716	155.66	± 6.064	122	± 6.082	-
7.81	103.66	± 4.910	105.66	± 5.783	84.33	± 4.176	32.28%**
15.6	95	± 3.605	102.66	± 6.173	86.33	± 2.905	34.51%***
31.2	88.66	± 6.741	101	± 5.001	84.66	± 6.173	36.74%**
62.5	91.33	± 4.055	97.33	± 4.630	83.33	± 2.905	37.27%**
125	93	± 5.859	96.33	± 2.962	85	± 4.358	36.74%**
250	93.33	± 3.282	97	± 5.196	79	± 6.429	37.89%**
500	88	± 5.773	96	± 4.041	80	± 4.725	39.12%**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.7 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica, de *R. chalepensis* in vitro en contra de *P. gingivalis* por el método de MTT y UFC.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *R. chalepensis* contra *P. gingivalis* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual los microorganismos se sometieron a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.7.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *R. chalepensis in vitro* contra de *P. gingivalis* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que la fracción hexánica de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *P. gingivalis* a partir de una concentración de 7.81 µg/mL ($p < 0.01$), en donde la concentración de 500 µg/mL ($p < 0.05$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXVII).

Tabla XXVII. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>Ruta chalepensis in vitro</i> contra <i>Porphyromonas gingivalis</i>. (Método MTT)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control ^c	0.356	± 0.009	0.418	± 0.004	0.348	± 0.010	-
7.81	0.454	± 0.018	0.539	± 0.011	0.429	± 0.003	1.26**
15.6	0.429	± 0.037	0.484	± 0.041	0.392	± 0.027	1.16**
31.2	0.404	± 0.019	0.551	± 0.008	0.433	± 0.039	1.23*
62.5	0.413	± 0.072	0.503	± 0.023	0.435	± 0.001	1.20**
125	0.450	± 0.015	0.547	± 0.018	0.445	± 0.008	1.28**
250	0.444	± 0.023	0.471	± 0.005	0.426	± 0.001	1.19**
500	0.439	± 0.023	0.485	± 0.001	0.466	± 0.010	1.23*

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.7.2 Análisis de la actividad antibacteriana *in vitro* de la fracción hexánica de *R. chalepensis* en contra de *P. gingivalis* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que la fracción hexánica de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *P. gingivalis* a partir de una concentración de 7.81 µg/mL ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 µg/mL ($p < 0.001$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de <i>Ruta chalepensis</i> <i>in vitro</i> contra <i>Porphyromonas gingivalis</i>. (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	513.33	± 18.278	477.33	± 6.936	333	±6.429	-
7.81	530.33	± 18.487	530	± 21.656	374.33	± 9.701	1.083*
15.6	521.33	± 6.064	523.66	± 6.437	378.33	±19.055	1.075*
31.2	515	± 29.206	506.66	± 30.344	404	±3.464	1.077
62.5	541	± 12.013	544.66	± 11.200	424.66	±6.741	1.141*
125	583	± 5.567	562.66	± 12.719	426.66	±6.333	1.187**
250	571.66	± 2.962	568.66	± 8.685	444.33	±5.206	1.197**
500	588	± 8.386	562.66	± 4.910	417.66	±2.962	1.184***

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.8 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción hexánica, de *R. chalepensis* *in vitro* en contra de *C. albicans* por el método de MTT y UFC. Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción hexánica de *R. chalepensis* contra *C. albicans* se

empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual los microorganismos se sometieron a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.8.1 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción hexánica de *R. chalepensis in vitro* en contra de *C. albicans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que la fracción hexánica de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXVIV).

Tabla XXIX. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción hexánica de <i>Ruta chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>Candida albicans</i>. (Método MTT)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control ^c	0.3653	± 0.0155	0.4239	± 0.0007	0.3514	± 0.0047	-
7.81	0.4432	±0.0027	0.44	± 0.0111	0.4295	± 0.0031	1.150*
15.6	0.4252	± 0.0333	0.4511	± 0.0206	0.3990	±0.017 3	1.118*
31.2	0.4128	± 0.0085	0.4553	± 0.0054	0.4333	± 0.0394	1.140*
62.5	0.4854	± 0.0082	0.495	± 0.0184	0.4362	± 0.0004	1.241**
125	0.4621	± 0.0068	0.444	± 0.0202	0.4441	± 0.0084	1.183*
250	0.4461	± 0.0169	0.468	± 0.0050	0.4296	± 0.0116	1.178**
500	0.4515	± 0.0201	0.476	±0.0041	0.4794	± 0.0075	1.233*

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.8.2 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción hexánica de *R. chalepensis in vitro* contra de *C. albicans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que la fracción hexánica de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXX).

Tabla XXX. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción hexánica de <i>Ruta chalepensis in vitro</i> sobre la proliferación de <i>Candida albicans</i> . (Método UFC)							
Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	326.333	± 4.841	251	± 9.073	256.66	± 9.279	-
7.81	352	± 11.930	258.33	± 5.811	275.33	± 10.413	1.061*
15.6	354	± 4.932	275	± 10.692	272.66	± 4.702	1.081**
31.2	376	± 4.358	277.33	± 6.936	268.66	± 3.480	1.105*
62.5	427	± 8.386	288.33	± 2.603	277	± 5.291	1.189
125	392.333	± 3.179	267	± 5.859	316.33	± 10.651	1.169*
250	432.333	± 14.251	285.33	± 4.702	325	± 2.081	1.250*
500	428	± 10.159	288.66	± 4.055	321	± 6.350	1.244*
^a Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.							

7.9 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo, de *R. chalepensis in vitro* en contra de *S. mutans* por el método de MTT y UFC.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* contra *S. mutans* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual los microorganismos se sometieron a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.9.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis in vitro* contra *S. mutans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que la fracción acetato del etilo de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano significativo de 48.7% a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 19.35% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla XXXI).

Tabla XXXI. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>Ruta chalepensis in vitro</i> contra <i>Streptococcus mutans</i>. (Método MTT)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		% de Inhibición ^b
Control ^c	0.3614	± 0.0307	0.7495	± 0.0531	1.5441	± 0.0461	-
7.81	0.3074	± 0.0382	0.5884	± 0.0890	1.6636	± 0.2614	19.35%
15.6	0.2873	± 0.0416	0.6389	± 0.0708	1.9487	± 0.1203	16.62%
31.2	0.2761	± 0.0304	0.731	± 0.0180	1.6857	± 0.0982	9.34%
62.5	0.2346	± 0.0318	0.7546	± 0.0130	1.7071	± 0.0773	10.98%
125	0.2597	± 0.0131	0.6322	± 0.0554	1.4438	± 0.0538	19.70%***

250	0.2100	± 0.0137	0.5645	± 0.0908	1.1139	±0.0098	30.27%*
500	0.1688	± 0.0012	0.401	± 0.1188	0.4975	± 0.0385	48.70%
^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.							

7.9.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* *in vitro* contra *S. mutans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que la fracción acetato del etilo de *R. chalepensis* mostró un efecto antibacteriano significativo de 30.68% a una concentración de 500 μ g/mL ($p < 0.05$) y de 15.30% a una concentración mínima inhibitoria de 7.81 μ g/mL (Tabla XXXII).

Tabla XXXII. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>Ruta chalepensis</i> <i>in vitro</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> . (Método UFC)							
Concentración (μ g/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
Control ^c	129.66	± 3.179	162.33	± 9.134	119.66	± 8.819	-
7.81	111	±4.841	130.33	±7.264	107	±5.507	15.30%
15.6	118.666	±2.027	112.66	± 15.213	93	±4.163	20.40%
31.2	102.66	± 4.977	110	± 6.350	103.33	±5.840	22.91%*
62.5	91.333	± 5.238	127.33	±5.174	92.66	±10.913	24.37%
125	85	± 3.055	115.33	±4.484	88.33	±1.855	29.87%*
250	92.333	±13.383	100.66	±10.837	99	±10.583	31.49%**
500	86.666	± 2.333	108.66	±8.875	93.33	±10.651	30.68%*

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control, por lo tanto es igual a 0. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p \leq .01$, ^{***} $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.10 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo, de *R. chalepensis in vitro* en contra de *P. gingivalis* por el método de MTT y UFC.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* contra *P. gingivalis* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual los microorganismos se sometieron a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.10.1 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis in vitro* contra *P. gingivalis* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que la fracción acetato del etilo de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *P. gingivalis* a partir de una concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXXIII).

Tabla XXXIII. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro sobre la proliferación de <i>Porphyromonas gingivalis</i>. (Método MTT)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación^b
Control ^c	0.3425	± 0.0081	0.3898	± 0.0232	0.3474	±0.0026	-
7.81	0.4250	±0.0044	0.4218	± 0.0053	0.4265	±0.0061	1.179*
15.6	0.3758	± 0.0047	0.4542	±0.0 156	0.3879	±0.0282	1.127**
31.2	0.4768	± 0.0034	0.4369	±0.0114	0.4333	±0.0394	1.247*
62.5	0.4122	± 0.0027	0.4704	±0.0187	0.4249	±0.0005	1.210***
125	0.4490	± 0.0137	0.5054	±0.0065	0.4451	±0.0084	1.296***
250	0.4403	±0.0096	0.4664	±0.0154	0.4325	±0.0160	1.240**
500	0.4655	± 0.0101	0.4732	±0.0069	0.4567	±0.0113	1.292**

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.10.2 Análisis de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* in vitro contra *P. gingivalis* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que la fracción acetato del etilo de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *P. gingivalis* a partir de una concentración de 7.81 µg/mL ($p < 0.01$), en donde la concentración de 500 µg/mL ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXXIV).

Tabla XXXIV. Efecto de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro sobre la proliferación de <i>Porphyromonas gingivalis</i> . (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	137.333	±2.027	122.33	±4.055	128.33	± 2.027	-
7.81	145.66	±4.371	135.66	±1.452	138.33	±3.527	1.081**
15.6	145	±5.291	145.66	±4.409	134	±2.886	1.094
31.2	154	±4.509	142.33	±2.403	143	±2.309	1.132**
62.5	148	±2.886	141.33	±5.840	146.66	±2.728	1.123**
125	163.333	±3.179	133.66	±6.359	138	±6.082	1.121*
250	153.333	±6.489	130.66	±4.096	145.33	±4.333	1.106**
500	157.66	±2.027	137	±4.041	147	±2.645	1.138**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ ***, $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.11 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo, de *R. chalepensis* in vitro en contra de *C. albicans* por el método de MTT y UFC.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* contra *C. albicans* se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual los microorganismos se sometieron a soluciones seriadas de los extractos (7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL) y a una concentración de MTT de 5mg/mL y por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de actividad antibacteriana e índice de proliferación.

7.11.1 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* *in vitro* contra *C. albicans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que la fracción acetato del etilo de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 µg/mL ($p < 0.05$), en donde la concentración de 500 µg/mL ($p < 0.01$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXX).

Tabla XXX. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>Ruta chalepensis</i> <i>in vitro</i> sobre la proliferación de <i>Candida albicans</i>. (Método MTT)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	0.4076	±0.0050	0.393	±0.0358	0.4028	±0.0328	-
7.81	0.4854	±0.0606	0.4351	±0.0109	0.446	±0.0337	1.135*
15.6	0.4649	±0.0331	0.4523	±0.0172	0.4788	±0.0313	1.160**
31.2	0.4699	±0.0387	0.4797	±0.0489	0.4838	±0.0400	1.191**
62.5	0.454	± 0.0421	0.5162	±0.0465	0.4806	±0.0436	1.205*
125	0.4813	±0.0299	0.5219	±0.0121	0.5185	±0.0088	1.264**
250	0.4619	±0.0694	0.5088	±0.1273	0.5283	±0.0127	1.245*
500	0.5102	±0.0067	0.5260	±0.0116	0.5215	± 0.0005	1.294**

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.11.2 Análisis de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de *R. chalepensis* contra *C. albicans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que la fracción acetato del etilo de *R. chalepensis* mostró una actividad de proliferación sobre *C. albicans* a partir de una concentración de 7.81 µg/mL ($p < 0.01$), en donde la concentración de 500 µg/mL ($p < 0.001$) fue la que mostró mayor estímulo (Tabla XXXVI).

Tabla XXXVI. Efecto de la actividad antifúngica de la fracción acetato de etilo de <i>Ruta chalepensis</i> in vitro contra <i>C. albicans</i> . (Método MTT)							
Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Índice de proliferación ^b
Control^c	150	±3.214	116.66	±2.333	122	± 5.033	-
7.81	159.333	±1.855	128.33	±2.603	128.66	±2.848	1.071**
15.6	173.333	±2.962	133.33	±4.176	129.33	±2.603	1.121*
31.2	162.333	±4.409	129.66	±5.696	131.33	±2.905	1.089**
62.5	178	±1.732	131.66	±3.756	134.33	±3.179	1.142*
125	165.333	±3.711	136.33	±4.409	136	± 3.605	1.126**
250	171.333	±2.027	133	±3.055	133	± 2.081	1.125**
500	173.333	±2.603	137.33	±2.403	142.66	±3.179	1.166***

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El índice de proliferación expresa la actividad de crecimiento bacteriana observada en cada concentración. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.12 Fraccionamiento cromatográfico biodirigido de la extracción I

Fraccionamiento cromatográfico de la partición hexánica

Columna 1

Para el fraccionamiento de la partición hexánica se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en hexano para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. 1 g de de la partición hexánica se disolvió en una pequeña cantidad de hexano para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml), cloroformo-acetato de etilo (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se eluyó la columna con 50 ml de metanol para arrastrar los compuestos más polares unidos a la sílica. Se colectaron 110 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 8 fracciones las cuales se denominaron fracciones colectivas (FC) y se evaluó su rendimiento (ver tabla XXXVII).

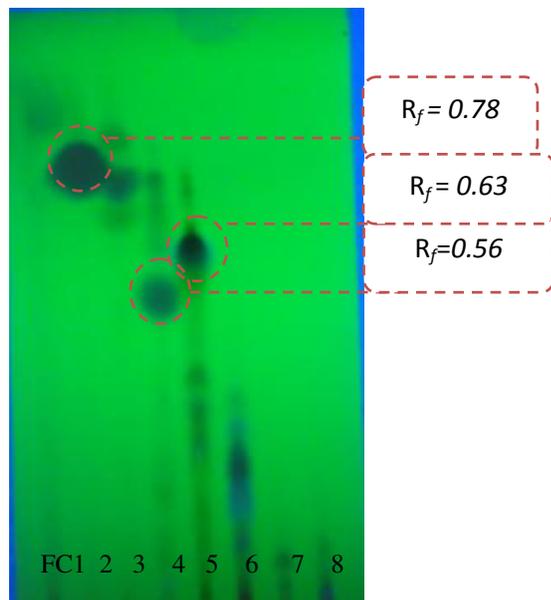


Figura 23. CCF de FC de Columna 1. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

FC	Fracciones mezcladas	Rendimiento (mg)
1	1-30	106.7
2	31-43	56.3
3	44-49	46.0
4	50-64	284.7
5	65-67	328.8
6	68-73	199.6
7	74-77	14.7
8	78-110	96.3

Tabla XXXVII. Rendimiento de FC de la columna 1

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 23).

En las FC 2, 4 y 5 se detectaron compuestos con un R_f de 0.78, 0.63 y 0.56 respectivamente, los cuales se encuentran con una pureza parcial y en una concentración adecuada para continuar la purificación de los mismos.

Columna 2

Fraccionamiento cromatográfico de FC2 de la columna 1 y aislamiento de C1

La FC2 perteneciente a la columna 1 contiene un compuesto con un R_f de 0.78 (CHCl_3 : EtOAc 9.5:0.5) el cual se encuentra con un grado parcial de pureza, además de encontrarse en una concentración adecuada para purificar esta fracción.

Para el desarrollo de esta columna se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil 100 ml de metanol. Se aplicó la totalidad de la muestra de la FC2 de 56.3 mg. Al final del proceso cromatográfico se recuperaron 20 fracciones, de 5 ml aproximadamente.

Una vez que se recuperaron las fracciones, estas fueron evaluadas por medio de CCF (figura 24) y se decidió agrupar las fracciones de acuerdo a su similitud con su R_f en 3 FC para posteriormente evaluar sus rendimientos, ver tabla XXXVIII.

FC	Fracciones mezcladas	Rendimiento (mg)
1	1-5	4.3
2	6	5.8
3	7-20	24.6

Tabla XXXVIII. Rendimientos de FC de la columna 2.

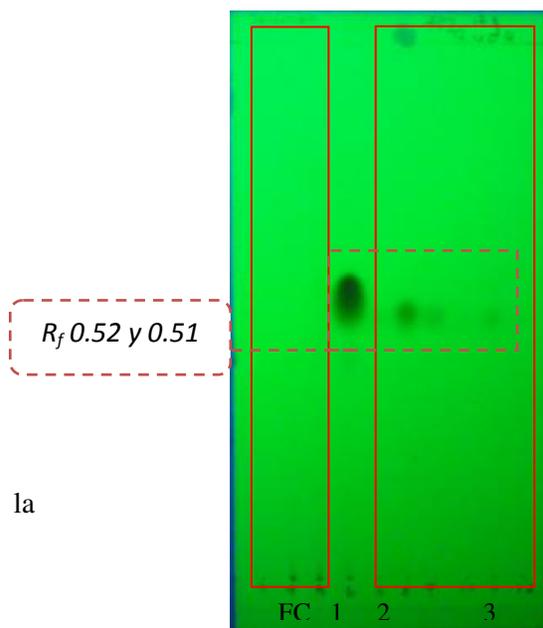


Figura 24. CCF de fracciones correspondientes a Columna 2. Eluente: CHCl_3 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

7.13 Análisis de la actividad antibacteriana de *Chalepentina in vitro* contra *S. mutans* por el método de MTT y UFC

7.13.1 Análisis de la actividad antibacteriana de *Chalepentina in vitro* contra *S. mutans* por el método de MTT

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que *Chalepentina* mostró un efecto antibacteriano significativo de 77% ($p < 0.001$) en una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 58% a una concentración de 7.8 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$) contra *S. mutans* (Tabla XXXIX).

Tabla XXXIX. Efecto de la actividad antibacteriana de <i>chalepentina in vitro</i> contra <i>Streptococcus mutans</i>. (Método MTT)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		% de Inhibición^b
Control ^c	0.611	± 0.014	0.589	± 0.017	0.542	± 0.010	-
7.8	0.312	± 0.057	0.190	± 0.031	0.168	± 0.019	58%**
15.62	0.365	± 0.021	0.271	± 0.011	0.192	± 0.026	47%**
31.25	0.270	± 0.026	0.266	± 0.049	0.177	± 0.022	55%***
62.5	0.120	± 0.006	0.241	± 0.016	0.214	± 0.030	69%**
125	0.132	± 0.012	0.303	± 0.058	0.170	± 0.010	63%**
250	0.126	± 0.007	0.257	± 0.057	0.157	± 0.020	68%**
500	0.138	± 0.018	0.134	± 0.009	0.142	± 0.014	77%***

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.13.1 Análisis de la actividad antibacteriana de *Chalepentina in vitro* contra *S. mutans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que *Chalepentina* mostró un efecto antibacteriano significativo de 71% ($p < 0.01$) a una concentración de 500 µg/mL y de 53% a una concentración de 7.8 µg/mL ($p < 0.05$) contra *S. mutans* (Tabla XL).

Tabla XL. Efecto de la actividad antibacteriana de *chalepentina in vitro* contra *Streptococcus mutans*. (Método UFC)

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
	Media	± Error estándar	Media	± Error estándar	Media	± Error estándar	
Control^c	45.2	±6.205	73.6	±8.981	89.5	±1.061	0
7.8	29.2	±2.286	37.5	±1.061	30.5	±1.714	53%*
15.62	13	±3.102	32.5	±3.184	38.5	±1.388	59%*
31.25	12.2	±1.796	36.1	±1.551	33.5	±4.000	60%*
62.5	27.3	±5.797	25.6	±2.612	31.6	±7.511	59%**
125	19.9	±4.000	19.3	±0.571	24.5	±3.184	69%**
250	22	±3.592	15.2	±2.286	20.7	±1.714	72%**
500	15.8	±0.653	19.2	±2.286	23.4	±3.919	71%**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.14 Análisis de la actividad antibacteriana de *Chalepensina in vitro* contra *P. gingivalis* por el método de MTT y UFC

7.14.1. Análisis de la actividad antibacteriana de *Chalepensina in vitro* contra *P. gingivalis* por el método de MTT

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que *Chalepensina* mostró un efecto antibacteriano 18.75% ($p < 0.01$) en una concentración de 15.62 $\mu\text{g/mL}$ y de 18.20% a una concentración mínima inhibitoria de 7.8 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$) contra *P. gingivalis* (Tabla XLI).

Tabla XLI. Efecto de la actividad antibacteriana de <i>chalepensina in vitro</i> contra <i>Porphyromonas gingivalis</i>. (Método MTT)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1^a		Exp2^a		Exp3^a		Inhibición del crecimiento^b
Control^c	1.3956	± 0.0543	1.27	± 0.1250	1.0273	± 0.0118	-
7.8	1.1453	± 0.0403	1.035	± 0.0945	0.826	± 0.0863	18.20%**
15.62	1.127	± 0.0654	1.0386	± 0.0231	0.845	± 0.0370	18.75%**
31.25	1.1923	± 0.1065	1.1873	± 0.0638	0.8973	± 0.0383	10.72%*
62.5	1.2233	± 0.1297	1.205	± 0.0303	0.92	± 0.0345	8.90%*
125	1.2696	± 0.1200	1.0973	± 0.1222	0.926	± 0.1118	11.20%**
250	1.2923	± 0.1542	1.0723	± 0.1549	0.9536	± 0.0477	11.29%*
500	1.329	± 0.1655	1.202	± 0.106	0.6706	± 0.1130	5.05%

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.14.2 Análisis de la actividad antibacteriana de *Chalepensina in vitro* contra *P. gingivalis* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que *Chalepensina* mostró un mayor efecto antibacteriano en un 24.04% ($p < 0.05$) a una concentración de 250 μ g/mL y de 10.49% a una concentración mínima inhibitoria de 7.8 μ g/mL ($p < 0.001$) contra *P. gingivalis* (Tabla XLII).

Tabla XLII. Efecto de la actividad antibacteriana de *chalepensina in vitro* contra *Porphyromonas gingivalis*. (Método UFC)

Concentración (μ g/ml)	Exp1 ^a		Exp2 ^a		Exp3 ^a		Inhibición del crecimiento ^b
Control^c	355.43	± 8.981	366.5	± 18.167	356.33	± 34.701	-
7.8	316.33	± 4.898	329.83	± 1.020	314.83	± 45.927	10.49%***
15.62	267.16	± 9.797	287.66	± 5.715	328.66	± 13.063	23.14%*
31.25	337.66	± 11.022	272	± 47.765	328.5	± 35.313	15.55%
62.5	332.33	± 14.288	282	± 22.045	320	± 3.674	14.90%
125	313.66	± 12.655	286.33	± 81.241	326.16	± 23.066	16.88%*
250	301	± 15.513	247.33	± 35.925	290.5	± 12.859	24.04%*
500	292	± 2.041	318	± 2.857	309.66	± 3.265	15.50%**

^a Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.15 Análisis de la actividad antifúngica de *Chalepensina in vitro* contra *C. albicans* por el método de MTT y UFC.

7.15.1 Análisis de la actividad antifúngica de *Chalepensina in vitro* contra *C. albicans* por el método de MTT.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con MTT, se observó que *Chalepensina* mostró un mayor efecto antifúngico en un 20.22% ($p < 0.01$) a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ y de 13.52% a una concentración mínima inhibitoria de 7.8 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$) contra *C. albicans* (Tabla XLIII).

Tabla XLIII. Efecto de la actividad antifúngica de <i>chalepensina in vitro</i> contra <i>Candida albicans</i>. (Método MTT)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Exp1^a		Exp2^a		Exp3^a		Inhibición del crecimiento^b
Control^c	0.6906	± 0.0188	0.6526	± 0.0453	0.64	± 0.0494	-
7.8	0.599	± 0.0062	0.5626	± 0.0146	0.5986	± 0.0481	13.52%*
15.62	0.6056	± 0.0341	0.5546	± 0.0235	0.5326	± 0.0833	13.62%**
31.25	0.5733	± 0.0129	0.587	± 0.0556	0.4696	± 0.0231	13.62%*
62.5	0.5823	± 0.0356	0.5486	± 0.0329	0.5263	± 0.0654	15.80%***
125	0.5863	± 0.0223	0.596	± 0.0112	0.466	± 0.0483	11.98%*
250	0.5666	± 0.0407	0.505	± 0.0468	0.4643	± 0.0366	20.22%**
500	0.608	± 0.0597	0.5046	± 0.0538	0.4903	± 0.0213	17.17%**

^a Valores de absorbancia (570nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en el crecimiento basal (grupo control). Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El Porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. Representa la media \pm el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.15.2 Análisis de la actividad antifúngica de *chalepentina* *in vitro* contra *C. albicans* por el método de UFC.

Por medio del análisis de los resultados del ensayo con UFC, se observó que *Chalepentina* mostró un mayor efecto antifúngico en un 24.14% ($p < 0.01$) a una concentración de 500 µg/mL y de 2.76% a una concentración mínima inhibitoria de 7.8 µg/mL contra *C. albicans* (Tabla XLIV).

Tabla XLIV. Efecto de la actividad antifúngica de <i>chalepentina</i> <i>in vitro</i> contra <i>Candida albicans</i>. (Método UFC)							
Concentración (µg/ml)	Exp1^a		Exp2^a		Exp3^a		Inhibición del crecimiento^b
Control^c	115.333	±1.224	143.5	±7.756	149.66	±15.105	-
7.8	111.66	±1.632	140	±17.962	125	±10.614	2.76%
15.62	99	±12.655	130	±1.632	142.66	±17.146	11.52%**
31.25	102.66	±6.123	111	±8.164	123.66	±4.082	17.45%**
62.5	98.66	±3.265	112	±4.898	140.66	±19.595	18.60%**
125	110.33	±8.981	115	±4.899	132.33	±24.494	12.94%
250	89.66	±6.123	118.33	±11.022	125	±14.288	19.63%
500	81.66	±5.307	114.66	±22.453	110.33	±6.123	24.14%**

^a Los valores representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con tres repeticiones por tratamiento. ^b El porcentaje de inhibición expresa la actividad antimicrobiana observada en cada concentración con respecto a la actividad observada en el grupo control. ^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 3 repeticiones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p \leq .01$ *** $p \leq .001$ comparado con el control sin tratar.

7.16 Resultados Espectroscópicos

7.16.1 Análisis espectrométrico y espectroscópico del compuesto C1

Análisis de espectrometría de masas

En la figura 25 se muestra un espectro de espectrometría de masas por el método de ionización por electrospray en su modo positivo, en el cual se puede observar el aducto del ion molecular con un protón $[M+H]^+$ a $m/z = 255.1$. También se observa el aducto del ion molecular con el ion sodio $[M+Na]^+$ a $m/z = 277.1$. Estos aductos permiten identificar el peso del compuesto al restar el peso del protón y del ion sodio respectivamente, quedando la masa del compuesto en 254.1 uma. Del mismo modo y de una forma confirmatoria de la masa del compuesto **C1** se ubicó la señal producida por el ion $[2M+Na]^+$ a $m/z = 531.2$.

El espectro de alta resolución de (+)-HR-ESI-MS de la figura 26 muestra de nuevo varios aductos simples del compuesto **C1**, primero se ubica el aducto $[M+H]^+$ a $m/z = 255.1014$, y a continuación el aducto $[M+Na]^+$ con una masa de 277.0835. Los valores de peso molecular calculados para $C_{16}H_{15}O_3$ y para $C_{16}H_{14}NaO_3$ son 255.1016 y 277.0835, respectivamente, lo cual concuerda con el peso molecular de los dos primeros aductos indicados arriba. Se propone por lo tanto la fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$ para el compuesto **C1**, después de abstraer un átomo de H o de Na, respectivamente.

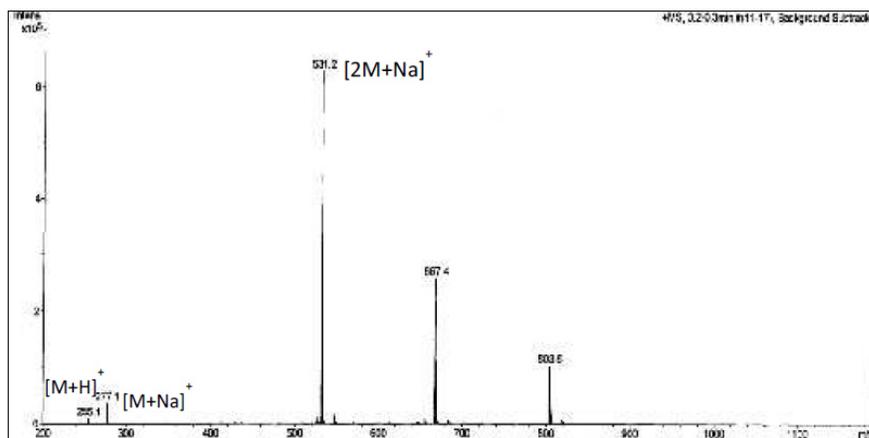


Figura 25. Espectro de masas (+)-ESI-MS del compuesto **C1**

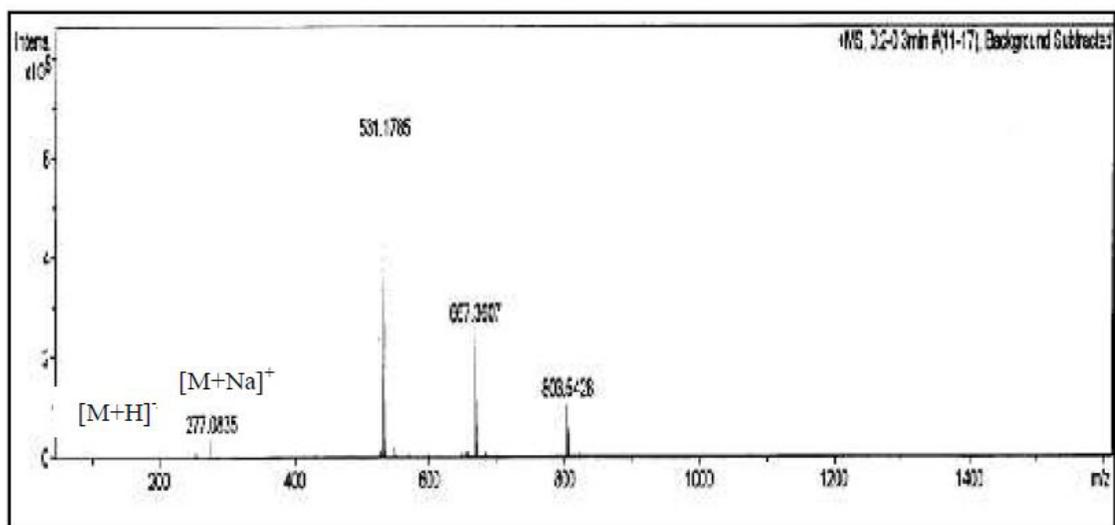


Figura 26. Espectro de masas de alta resolución (+)-HR-ESI-MS del compuesto **C1**.

7.16.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

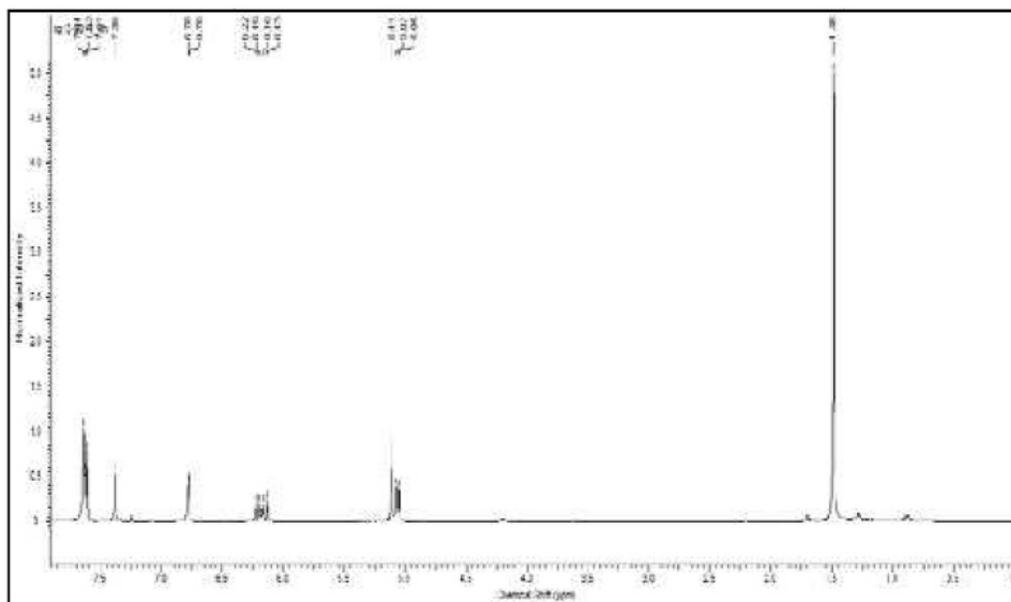


Figura 27. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C1** en CDCl_3 .

En el espectro de ^1H -RMN de la figura 27 se procedió primero a identificar la señal correspondiente al solvente sin deuterar (CHCl_3) a 7.25 ppm. Una vez identificada esta señal es posible observar claramente 8 señales correspondientes al compuesto **C1**, las señales A, B, C y D están representadas por cuatro singuletes (s) con desplazamientos de 7.64, 7.63, 7.61 y 7.37 ppm respectivamente, las cuales integran para cuatro metinos de protones aromáticos. La señal E con un desplazamiento de 6.78 ppm y una multiplicidad de doblete (d) así como la señal F con desplazamiento a 6.18 ppm y una multiplicidad de doblete (dd) integra cada una para 1 protón. La señal E tiene acoplamiento con un metino en la región de aromáticos (señal B) y la señal F posee un acoplamiento con la señal de un protón de la región de aromáticos (señal G). Por otra parte la señal G con un desplazamiento a 5.08 ppm tiene multiplicidad de multiplete (m) integra para dos protones y finalmente a 1.48 ppm se ubica la señal H la cual está representada como un singulete que integra para 6 protones en el área de grupos metilo. Los datos obtenidos de este espectro se resumen en la tabla XLV.

Señal	δ	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
A	7.64	s		1H
B	7.63	s		1H
C	7.61	s		1H
D	7.37	s		1H
E	6.78	d	1.20	1H
F	6.18	dd	10.86, 17.30	1H
G	5.08	m		2H
H	1.48	s		6H

Tabla XLV. Resumen de señales del espectro de ^1H -RMN de **C1**.

También se realizó un análisis bidimensional de RMN para poder observar las correlaciones que hay entre las señales de los protones del compuesto a través de 3 o más enlaces. En la figura 28 se presenta un espectro de COSY (Correlation Spectroscopy).

El análisis de este espectro permite ubicar dos correlaciones a largo alcance entre las señales G (5.08 ppm) y la señal H (1.48 ppm) además de la correlación de la señal A (7.64 ppm) con la señal H. Esto permite identificar la cercanía que existe entre los grupos metilo de la señal H con el anillo aromático donde se encuentra la señal A.

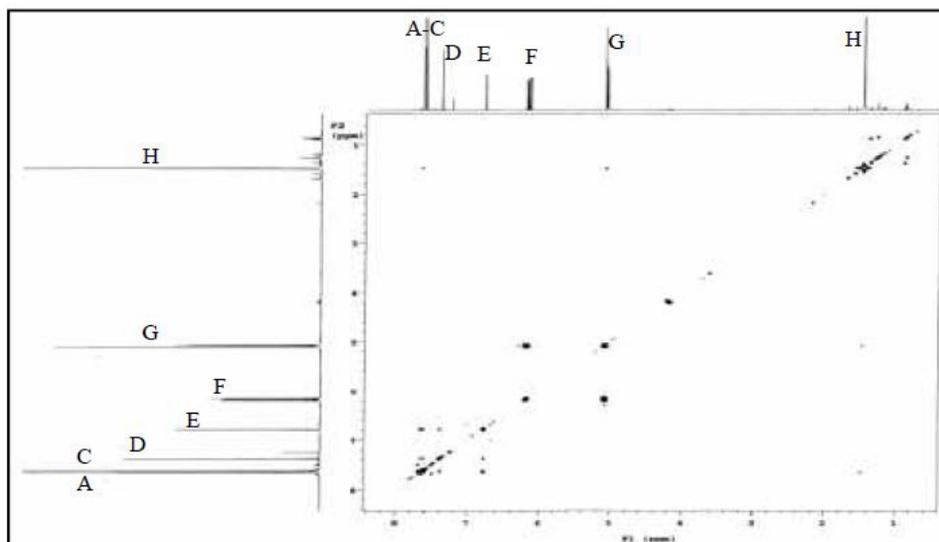


Figura 28. Espectro general de COSY del compuesto **C1** en CDCl_3 .

En una ampliación del espectro de COSY (figura 29) se pueden observar más claramente las correlaciones que existen entre los protones aromáticos así como el acoplamiento de un protón vinílico. Primeramente se observa la correlación entre la señal B (7.63 ppm) y la señal E (6.78 ppm) a 3 enlaces identificando a estos protones como vecinos. El acoplamiento del protón F (6.18 ppm) con los protones G (5.08 ppm) parecen indicar la presencia de un doble enlace terminal. Además de estos acoplamientos entre protones vecinos se puede ubicar la señal de un acoplamiento a largo alcance entre la señal D (7.37 ppm) y E (6.78 ppm).

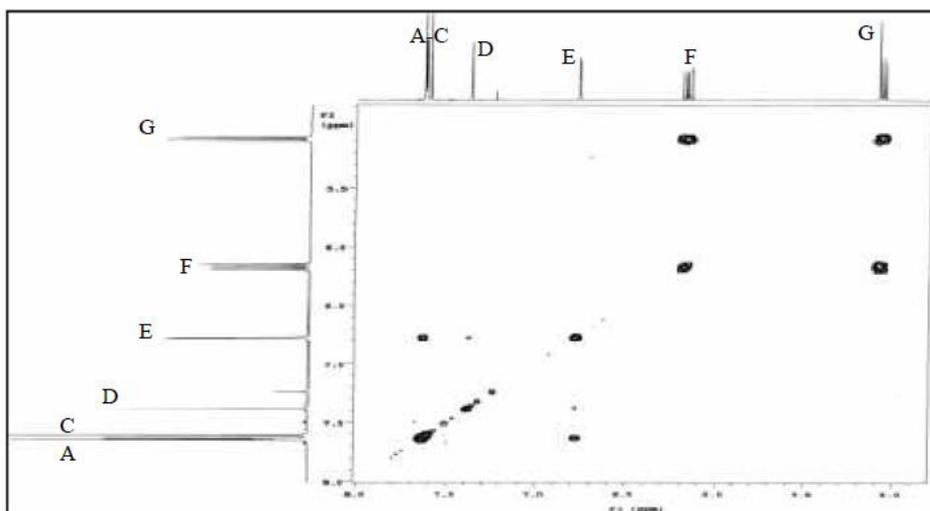


Figura 29. Ampliación del espectro COSY del compuesto **C1** en CDCl_3 .

En la tabla XLVI se resumen los acoplamientos registrados en el espectro COSY del compuesto **C1**.

Señal	Acoplamiento
A	H
B	E
C	
D	E
E	B, D
F	G
G	F, H
H	A, G

Tabla XLVI. Acoplamientos registrados espectro COSY del compuesto **C1**.

Por otra parte en el espectro de ^{13}C -RMN, de la misma forma que en el espectro de protones se identificó la señal correspondiente al solvente sin deuterar (CHCl_3) con un desplazamiento que va de 77.25 a 76.74 ppm. Después de descartar la señal del solvente

se pueden identificar 15 señales correspondientes al compuesto bajo estudio, ver figura 30.

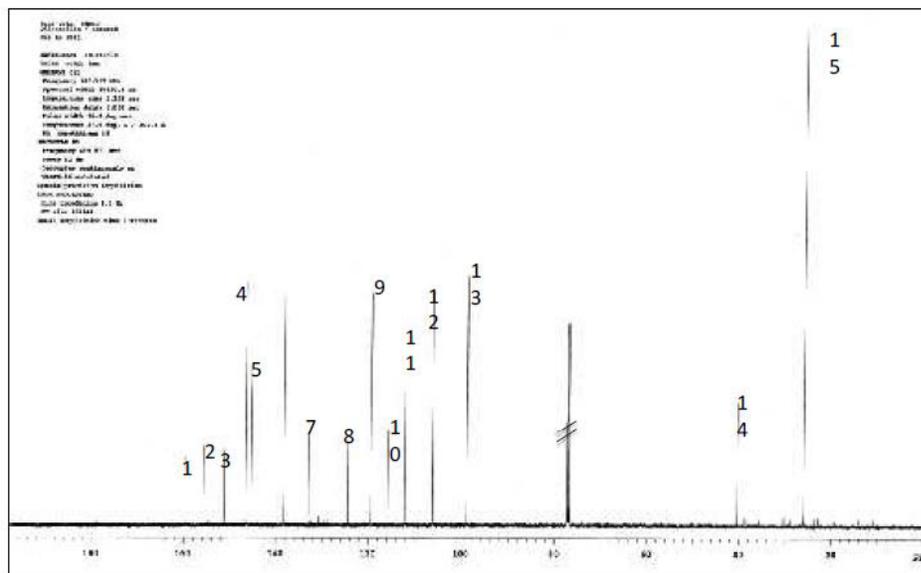


Figura 30. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto C1 en CDCl_3 .

Las señales de los carbonos 1, 2 y 3 presentan un desplazamiento superior a 150 ppm lo que permite ubicar a estos carbonos unidos a átomos más electronegativos que el carbono, en este caso unidos a átomos de oxígeno. El desplazamiento del carbono 1 (159.81 ppm) pertenece a un grupo carbonilo de lactona. La influencia del oxígeno con hibridación sp^3 del grupo lactona disminuye el desplazamiento común de un grupo carbonilo de cetona, el cual fluctúa entre 185 y 210 ppm. Con respecto al resto de las señales, se pueden clasificar como señales de carbonos aromáticos u olefínicos (hibridación sp^2) de la señal 2 a la señal 13, en tanto las señales 14 y 15 corresponden a carbonos alifáticos; aunque el espectro presenta solo 15 señales, la señal número 15 corresponde a dos carbonos los cuales son simétricos y presentan el mismo entorno químico. Para la completa clasificación de estas señales se hizo uso de otra técnica bidimensional de RMN, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). El empleo de esta técnica nos permite conocer el acoplamiento carbono-hidrógeno (^{13}C - ^1H) a un enlace, de esta forma se logró adjudicar determinada señal de un protón a una determinada señal de carbono y al mismo tiempo confirmar la correcta clasificación de

las señales del espectro de ^{13}C -RMN en metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios, tabla XLVII.

Señal	δ	Clasificación
1	159.81	Cq
2	155.77	Cq
3	151.21	Cq
4	146.51	CH
5	145.38	CH
6	138.25	CH
7	133.03	Cq
8	124.51	Cq
9	119.46	CH
10	115.84	Cq
11	112.25	CH ₂
12	106.27	CH
13	98.84	CH
14	40.44	Cq
15	26.08	CH ₃
16	26.08	CH ₃

Tabla XLVII. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **C1**.

En la figura 31 se muestra el espectro de HSQC en el cual se pueden observar los acoplamientos C-H a un enlace del compuesto **C1** y en la tabla XLVIII se resumen los acoplamientos C-H que muestra este espectro.

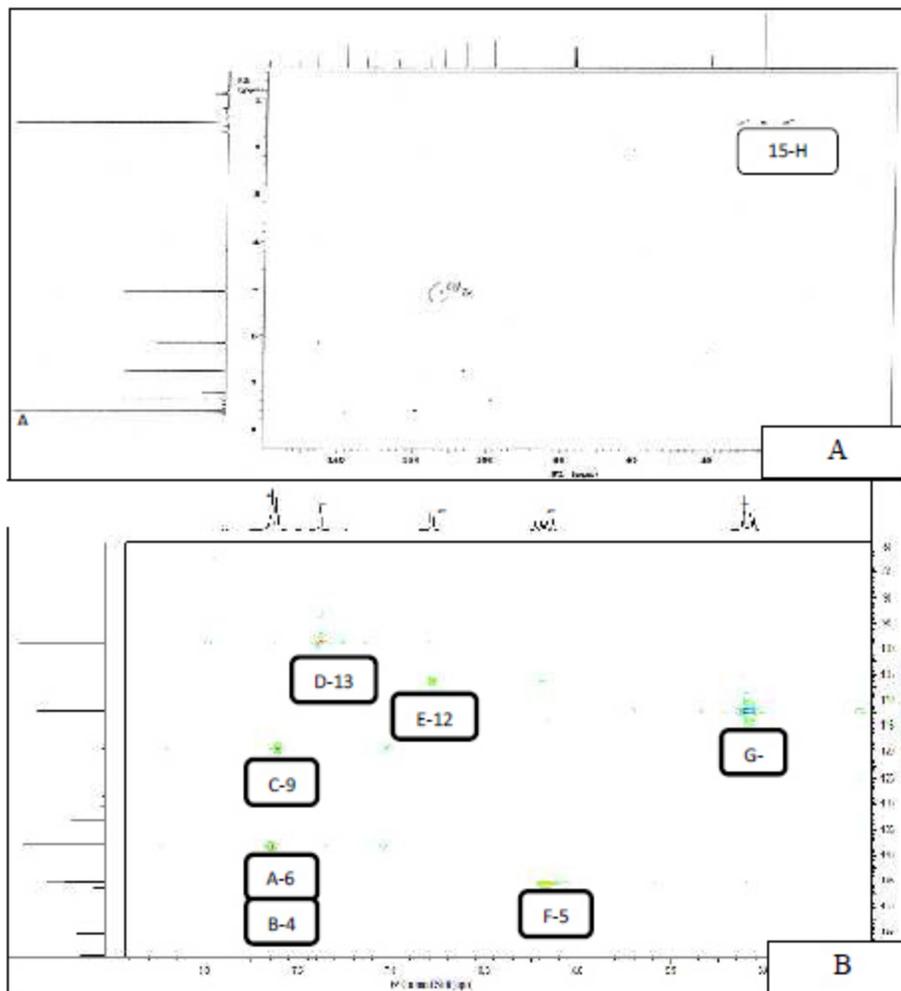


Figura 31. Espectro de HSQC del compuesto **C1**. A, espectro general de HSQC. B, ampliación del espectro de HSQC. ^1H : 4.5-8.5 ppm ^{13}C : 80-165 ppm.

Una vez establecidos los acoplamientos C-H a un enlace que se produjeron se puede confirmar que los carbonos 1, 2, 3, 7, 8, 10 y 14 son carbonos cuaternarios de los cuales solamente el carbono 14 pertenece a una cadena alifática del compuesto, los otros carbonos pertenecen a la región de aromáticos y olefínicos. Con los que respecta a las señales de los carbonos 4, 5, 6, 9, 12 y 13 son metinos, en tanto la señal 11 corresponde a un metileno olefínico. La señal del carbono 15 corresponde a dos grupos metilo de la región alifática, a esta conclusión se llega basándonos en la integración de 6 protones para la señal H en el espectro de ^1H -RMN, esta situación se presenta debido a que ambos grupos metilos son simétricos y presentan el mismo entorno químico. Cada uno

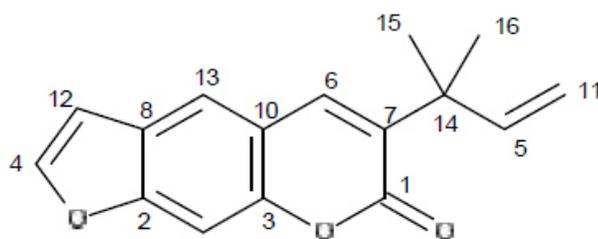
de los acoplamientos antes mencionados se representa mostrando solamente el desplazamiento químico de las señales de protones ($\delta^1\text{H}$) en la fila del carbono correspondiente.

Señal	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta^1\text{H}$
1	159.81		
2	155.77		
3	151.21		
4	146.51	9, 8, 3, 2, 1	7.63
5	145.38	16, 15, 14	6.18
6	138.25	14, 13, 10, 3, 1	7.64
7	133.03		
8	124.51		
9	119.46	13, 12, 6, 3, 2	7.61
10	115.84		
11	112.25	14, 5	5.08
12	106.27	8, 4, 2	6.78
13	98.84	10, 8, 3, 2	7.37
14	40.44		
15	26.08	16, (15), 14, 7, 5	1.48
16	26.08	(16), 15, 14, 7, 5	1.48

Tabla XLVIII. Resumen de correlaciones del espectro de HSQC y HMBC del compuesto **C1**

Además de los análisis que se realizaron al compuesto para identificar los acoplamientos de C-H a un enlace y conocer la naturaleza de cada una de las señales tanto del espectro de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN, se realizó un análisis de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) con el cual podemos observar los acoplamientos C-H a 2 o 3 enlaces y en sistemas conjugados hasta 4 enlaces, este tipo de información nos permite deducir la conectividad que hay entre los carbonos e hidrógenos de determinadas regiones de la molécula y de esta forma confirmar la correcta asignación de los carbonos e hidrógenos en la molécula. En la XLVIII se muestra un resumen de las señales obtenidas del espectro de HMBC (columna HMBC) en el cual se muestran solamente el número de carbono con el cual se está produciendo un acoplamiento C-H. El tipo de información recopilada de cada una de las técnicas antes descritas permite deducir que la estructura posee un esqueleto carbonado semejante a la estructura base de furanocumarinas

compuestos muy abundantes en esta planta. Posee una cadena hidrocarbonada, 2-*metilbut-3-en-2-ilo* como sustituyente en la posición 2 de la estructura. Finalmente reuniendo esta información se identifica al compuesto **C1** como 6-(2-*metilbut-3-en-2-ilo*)furo[3,2-*g*]cromen-7-ona, el cual tiene como nombre común chalepensina figura 32 , ya que el punto de fusión (Tian-Shung y col., 2003) y los datos espectroscópicos aquí reportados coinciden con los datos disponibles en la literatura científica (El-Belh y col., 1981; Tian-Shung y col., 2003).



PM: 254.28
 $C_{16}H_{14}O_3$

Figura 32. Estructura del compuesto **C1**, chalepensina.

8. DISCUSIÓN

Las enfermedades bucodentales continúan siendo un importante problema de salud a nivel mundial (Petersen, 2005). Problemas como el cáncer orofaríngeo y las lesiones en tejidos blandos son consideradas problemas de salud oral; sin embargo, la caries dental, la enfermedad periodontal y la candidiasis oral son consideradas las más importantes (Petersen, 2003). La caries dental es una enfermedad infecciosa transmisible que continúa representando un importante problema de Salud Pública en muchos países en desarrollo y en las poblaciones desfavorecidas en países desarrollados (Mattos y col., 1998; Ramos y col., 2002).

La búsqueda de sustancias provenientes de fuentes naturales, ha desplegado un gran interés por parte de los investigadores, con la finalidad de una alternativa terapéutica para diversas enfermedades infecciosas. Los productos naturales representan una rica fuente de compuestos biológicamente activos, que son un ejemplo de la diversidad molecular con un alto potencial en el desarrollo de drogas (Newman and Cragg, 2007; Harvey, 2000; Grabley y col., 1999).

México es un país de gran diversidad florística. Se estima que la flora medicinal en uso contiene alrededor de 5000 plantas. Su estudio, tan sólo con fines de inventario de los recursos, es complejo y lento (Lozoya, 1982). Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional popular mexicana y han representado desde siempre una alternativa a otro tipo de recursos para la salud (Aguilar y col., 1994).

Existen por lo menos 120 compuestos químicos derivados de plantas que son considerados como drogas de importancia médica, comercializados por industrias farmacéuticas en más de un país del mundo (Taylor, 2000). Entre diversos campos de investigación, uno de los más importantes es el efecto de extractos de plantas sobre los microorganismos, ya que se conoce una gran cantidad de compuestos vegetales que tienen actividad antimicrobiana, producidos por las plantas para su defensa del ataque de

patógenos como virus, bacterias, hongos y protozoarios. Son compuestos que la planta sintetiza como parte normal de su ciclo celular o al ser atacada por patógenos (Murphy, 1999).

Los extractos naturales obtenidos de plantas han demostrado tener un potencial farmacológico muy importantes sobre diferentes enfermedades que aquejan al hombre en la actualidad, así la etnobotánica ha jugado un papel importante en el desarrollo de nuevas drogas por muchos siglos. Esta importancia del reino vegetal como fuente de drogas curativas o para el tratamiento de ciertas enfermedades, ha llevado a comprobar que el 25 % de los fármacos existentes en el mercado son derivados de plantas (Méndez, 1989).

La búsqueda de compuestos antimicrobianos y antifúngicos en la Herbolaria Tradicional Mexicana ha tomado gran importancia ya que existe una bibliografía etnobotánica local abundante en el uso de plantas en la forma de extractos crudos e infusiones para tratar infecciones (Navarro y col., 1996).

Esta investigación se enfocó en probar los extractos metanólicos, acuosos y etanólicos de *Ruta chalepensis*, sobre *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans*, para evaluar su actividad antimicrobiana y antifúngica, así como determinar la actividad biológica de las fracciones de los extractos metanólicos de ruda de la fracción hexánica y acetato de etilo con la finalidad de identificar la fracción con mayor actividad antimicrobiana sobre los ya mencionados microorganismos y definir la estructura química del compuesto(s) bioactivos. *R. chalepensis* es una planta con importantes actividades biológicas como antirreumático, emenagogo y antihelmíntico (Fon Quer, 1962; Di Stasi y col., 1994) así como también antihipertensivo (Berdoncés, 1998), presenta también efectos antiinflamatorios y ayuda en los trastornos gastrointestinales, entre los microorganismos sobre los que actúa están *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* debido a la presencia de compuestos derivados de quinolonas (Jang-Hee y col. 2005), también exhibe actividad larvicida proporcionada por furanocumarinas y alcaloides quinolínicos (Emam y col. 2009) también se ha demostrado que plantas de

la familia Rutaceae presentan actividad tripanocida (Atta-ur-Rahman y col., 1998; López and Wagner, 1997; Biavatti y col., 2002).

Actualmente no existen estudios que asocian la actividad antimicrobiana de *R. chalepensis* sobre *Streptococcus mutans*, sin embargo como se observa en nuestros resultados el extracto metanólico de la hoja de *R. chalepensis* mostró tener un efecto antimicrobiano significativo sobre *S. mutans* a 500µg/mL ($p < 0.001$), mientras que el extracto acuoso y etanólico no mostraron efecto antimicrobiano, sino que estimularon la proliferación de *S. mutans*. En una investigación realizada en una población mexicana se evaluó la actividad antibacteriana de extractos acuosos y metanólicos de *R. chalepensis* a una concentración de 8mg/ML frente a especies enteropatógenas en donde se mostró que los extractos metanólicos eran más activos que los acuosos (Alanis, A. D., y col., 2005).

Existen reportes previos en donde el extracto metanólico de *R. chalepensis* mostró un actividad importante sobre el sistema nervioso central de cobayos, retrasando la aparición de convulsiones inhibiendo la contracción inducida en el íleon (Aguilar y Tortoriello. 1996) , siendo el efecto dependiente de la concentración, que probablemente sea lo que ocurre con *R. chalepensis* y *Streptococcus mutans*. Los extractos metanólicos, acuosos y etanólicos de *R. chalepensis* mostraron efecto antibacteriano contra *Porphyromonas gingivalis* a una concentración máxima de 500µg/mL ($p < 0.001$). Se ha demostrado que el 63% de las especies botánicas muestran propiedades antifúngicas en contra de *C. albicans* (Abad y col., 2007). El extracto metanólico de *R. chalepensis* mostró tener actividad contra *C. albicans* a la más alta concentración, probablemente el efecto se deba a componentes del aceite esencial y con actividad antifúngica siendo el Undecan-2-one en donde la mayor parte de las fracciones volátiles presentan actividad contra diferentes especies de *Candida sp* (Bnina y col., 2010). Los extractos acuosos y etanólicos mostraron tener actividad proliferativa en *C. albicans*.

La fracción hexánica y acetato de etilo de *R. chalepensis* mostraron tener actividad antibacteriana significativa sobre *S. mutans* a una concentración de 500 µg/mL ($p < 0.01$), mientras que contra *P. gingivalis* y *C. albicans* mostraron tener actividad proliferativa sobre ambos microorganismos.

El siguiente paso para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos y antifúngicos es el aislamiento del compuesto activo y el análisis de su mecanismo de acción ya que enfocarse sólo a la investigación de los extractos crudos limitaría su uso potencial para la industria farmacéutica (Spainhour, 2005; Harvey and Cree, 2010). En base a los análisis de ^1H - y ^{13}C -RMN se determinó que el compuesto **C1**, por comparación con datos espectroscópicos ya reportados en la literatura científica (El-Belh y col., 1981; Tian-Shung y col., 2003; Yang y col., 2007) se pudo identificar como chalepensina (ver figura 32), compuesto ya aislado de esta planta (Ezmirly and Milson, 1980), sin embargo no existen a la fecha reportes acerca de su actividad antimicrobiana contra microorganismos que producen enfermedades en cavidad bucal, por lo que el resultado obtenido en nuestra investigación es el primero.

La chalepensina mostró un efecto antimicrobiano significativo a una concentración $500\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$) contra *S. mutans*, mientras que contra *P. gingivalis* mostró un efecto antimicrobiano a una concentración de $500\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$) y a una concentración de $500\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$) contra *C. albicans*.

9. CONCLUSIONES

Al finalizar la presente investigación se llegaron a las siguientes conclusiones:

1. El extracto metanólico de *R. chalepensis* presentó actividad antimicrobiana *in vitro* inhibiendo el crecimiento de *Streptococcus mutans*.
2. Los extractos acuoso y etanólico de *R. chalepensis* estimularon la proliferación de *S. mutans*.
3. El extracto metanólico de *R. chalepensis* presentó actividad antimicrobiana *in vitro* inhibiendo el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.
4. Los extractos acuoso y etanólico presentaron actividad antimicrobiana *in vitro* mediante el método de UFC inhibiendo el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.
5. El extracto metanólico de *R. chalepensis* presentó actividad antimicrobiana *in vitro* inhibiendo el crecimiento de *Candida albicans*.
6. Los extractos acuoso y etanólico de *R. chalepensis* estimularon la proliferación de *C. albicans*.
7. Se realizó la partición del extracto metanólico de *R. chalepensis* con los solventes hexano y acetato de etilo y se evaluó su actividad antimicrobiana observando que ambas particiones poseen una actividad antimicrobiana relevante contra *S. mutans*.
8. Del fraccionamiento biodirigido realizado de la partición de hexano se aisló el compuesto denominado **C1**.
9. Se elucidó la estructura del compuesto aislado mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, APT, DEPT 135, HSQC, HMBC y HMQC) y espectrometría de masas. Además se determinó su actividad antimicrobiana y antifúngica.
10. Se determinó que el compuesto **C1** su estructura corresponde a la furanocumarina identificada como chalepensina.

11. La chalepensina mostró actividad antimicrobiana y antifúngica *in vitro* contra *S. mutans*, *P. gingivalis* y *C. albicans*.

10. LITERATURA CITADA

Abad M J, Ansuategui M. and Bermejo P.2007. Active antifungal substances from natural sources, *ARKIVOC* (vii) 116-145.

Ageel, A. M., Mossa, J. S., Al-Yahya, M. A., Al-Said, M. S., & Tariq, M. (1988). Experimental studies on antirheumatic crude drugs used in Saudi traditional medicine. *Drugs under experimental and clinical research*, 15(8), 369-372.

Aguilar A., Camacho J.R., Chino S., Jácquez P. y López M.E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS, México.

Aguilar-Santamaría, L., & Tortoriello, J. (1996). Anticonvulsant and sedative effects of crude extracts of *Ternstroemia pringlei* and *Ruta chalepensis*. *Phytotherapy Research*, 10(6), 531-533.

Akihisa T, Franzblau SG, Ukiya M, Okuda H, Zhang F, Yasukawa K, Suzuki T, Kimura Y. Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae flowers. *Boil. Pharm. Bull.*, 2005. 28(1): 158-160.

Alanis, A. D., Calzada, F., Cervantes, J. A., Torres, J., & Ceballos, G. M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 153-157.

Andrade SC, de Barros NF, De Novais RF Teixeira JL. Leal PGL, Exigencia y distribución de boro en plantas de eucalipto. *Bosque* (Chile), 1995. 16:53-59.

Appleton SS. Candidiasis: pathogenesis, Clinical characteristics and treatment. *J Calif Dent Assoc* 2000; 28: 942-948.

Araujo GR, Borroto CR. El problema de la determinación del proceso salud-enfermedad. Análisis crítico para su evolución. *Ataneo JCG.*, 1997. 2(2): 3.

Arenas, P., Savitry, GP.:“La Ruda: Ruta chalepensis (L.) Rutaceae. Doiinguezia; 1994, 11:7-25.

Atta-ur-Rahman NS, Iqbal MC, Pir MS, Riaz KM. 1998. Isolation and structural studies on the chemical constituents of *Skimmia laureola*. *Journal of Natural Products* 61:71.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:1001–1009

Berdoncés JL. 1998. *Gran Enciclopedia de Las Plantas Medicinales*. Barcelona: Tikal

Bnina, E. B., Hammami, S., Daamii-remadi, M., Jannet, H. B., & Mighri, Z. (2010). Chemical composition and antimicrobial effects of Tunisian *Ruta chalepensis* L. essential oils. *J. Soc. Chim. Tunisie*, 12, 1-9.

Burton D J, Routh JL. *Química orgánica y Bioquímica* 1ª edición McGraw- Hill México. 1977. pp. 231-249.

Carpio A. Estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral. PE1.1;TL-UPCH, QV770DP6,C28.2008.Lima

Caufield, P. W., & Griffen, A. L. (2000). Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Pediatric Clinics of North America*, 47(5), 1001-1019.

Calderone RA. Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone RA (Ed) *Candida and Candidiasis*, ASM Press, Washington, 2002. pp. 15-27.

Cannell RJP. 1998. Natural Products Isolation. Humana Press: Totowa, New Jersey pp. 111-140, 209-216, 265-269.

Clark WB, Loe H. Mechanisms of initiation and progression of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1993. 2: 72-82.

Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr. Opin. Infect. Dis*, 2002. 15: 569-574.

Colegate SM, Molyneux RJ. 2008. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination. CRC Press, Taylor & Francis Group: New York, pp. 41-54, 78-82.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999. 12: 564–582.

Chitme HR, Chandra R, Kaushik S. Studies on anti-diarrheal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. in experimental animals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2003. 7: 70–75.

Choi SS, Han KJ, Lee HK, Han EJ, Suh HW. Antinociceptive profiles of crude extract from roots of *Angelica gigas* NAKAI in various pain models. *Biol Pharm Bull.*, 2003. 26(9): 1283-8.

Dahlén G, Manji F, Baelum V, Ferjerskov O. Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. *J. Clin. Periodontol.*, 1989. 16: 305-310.

Dasanayake A. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann Periodontol.*, 1998. 3: 206-212.

De Filipps, R. 2001. Conservation of Brazilian medicinal plants. *In: Biological Conservation Newsletter*. Plant Conservation Unit. Department of Botany. *Smithsonian National Museum of Natural History*. 2001. pp 193.

Domínguez XA. 1973 *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 1ª edición. Editorial LIMUSA. México

Dzido TH, Tuzimski T. 2008. Chambers, Sample Application and Chromatogram Development. *In: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J and Kowalska T. (eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 119-168

El-Beih FK, El-Tawil BAH, Baghlaf AO. 1981. Constituents of local plants, Part 12. Coumarin and chalepensis, a further constituents of *Ruta chalepensis* L. *Journal Chinese Chemical Society* 28 237-238.

Ellingboe J, Nyström E, Sjövall J. 1970. Liquid-gel chromatography on lipophilichydrophobic Sephadex derivatives. *Journal of Lipid Research* 11:266-273.

Ellison SA. Oral bacteria and periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 1970. 49(2): 198-202.

Emam AM, Swelam ES, Megally NY. 2009. Furocoumarin and quinolone alkaloid with larvicidal and antifeedant activities isolated from *Ruta chalepensis* leaves. *Journal of Natural Products* 2:10-22.

Ezmerly ST, Wilson SR. 1980. Saudi Arabian medicinal plants I: *Ruta chaepensis*. *Journal of Chemical Society Pakistan* 2:55-57.

- Fon Quer P. 1962. Plantas Medicinales. Labor, Buenos Aires, 426 pp.
- Genco RJ, Evans RT, Ellison SA. Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. *J. Am. Dent. Assoc.*, 1969. 78(5): 1016-1036.
- Genco RJ, Zambon JJ, and Christersson LA. The origin of periodontal infection. *Adv. Dent. Res.*, 1998. 2(2): 245-259.
- Gómez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta RT. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J Clin Microbiol*, 1995. 33: 1842-1846.
- Gross JH. 2004. Mass spectrometry. A Textbook. Springer: Heidelberg, Alemania, pp. 1-10.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 1994. 5: 78-111.
- Hamada S, Slade H. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, 44: 331–384.
- Hnatyszyn, O., Arenas, P, Moreno, A, Rondita, R; Coussio, JD: “Plantas reguladoras de la fecundidad según la medicina folklórica”. *Rev Soc Cien.* 1974, 14:37 pp.
- Holt S, Kesavalu L, Walker S, Genco C. Virulence factors of *Porphyromona gingivalis*. *Periodontol 2000*, 1999. 20: 168-238.
- Ishikawa I, Baheni P. Nonsurgical periodontal therapy - where do we stand now *Periodontol 2000*, 2004. 36: 9-13.

Jang-Hee C, Chi-Hoon L, Hoi-Seon L. 2005. Antimicrobial activity of quinoline derivatives isolated from *Ruta chalepensis* toward human intestinal bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:646-651.

Kansal R, Gómez-Flores R, Mehta RT. Therapeutic efficacy of liposomal clofazimine against *Mycobacterium avium* complex (MAC) in mice depends on size of initial *inoculum* and duration of infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997.41:17-23.

Kaufman PB, Cseke LJ, Waber S, Duke JA, Briemann HL. *Natural Products from Plants*. CRC Press, USA 1999. pp. 88, 125, 153, 158-159, 165.

Ketterl W. Odontología conservadora cariología: Tratamiento mediante obturación. En: *Odontología (Colección)*. Ed. M. Salvat, 1994. pp. 29-50.

Kim HS. Do not put too much value on conventional medicines. *J. Ethnopharmacol.*, 2005. 100: 37–39.

Liébana J. *Microbiología oral*. Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, 2002. pp 677.

Loesche W. Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infect. Dis. Clin. Nth. Am.*, 2007. 21: 471–502.

Lozoya, X. y M. Lozoya. 1982. *Flora medicinal de México*. Primera Parte. Plantas indígenas, IMSS, México.18.

Mattos R, Zelante F, Line R, Mayer M. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res.*, 1998. 32: 319–323.

Méndez Iturbide, M.R. 1989. Efecto de *Montanoa tomentosa* y *Montanoa frutescens* sobre la gestación en ratas. Tesis de Licenciatura, IPN, México, D. F.

Miron. bucodental. Masson S.A. Barcelona, España, 1995. pp. 183.

Mouton C. Bacteriología bucodental. Masson S.A. Barcelona, España, 1995. pp. 183.

Murphy CM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microb. Rev.* 1999. 12(4):564-582.

Nakata. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res.*, 1998. 32: 319–323.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007;70:461-77.

Nikiforuk, G. (1986). Etiología de la Caries Dental-Un Repaso de las Primeras Teorías y Concepto Actuales. *Nikiforuk G. Caries Dental. Argentina: Editorial Mundi*, 3, 60-82.

Núñez ME. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore, Editorial Universidad de Costa Rica, 1982, pp. 318.

Olsen I, Shhah HN & Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromona gingivalis*. *Periodontol* 2000, 1999. 20: 14-52.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Problema mundial de las enfermedades bucodentales. 2004. [Fecha de acceso 2004/04/04]. URL disponible en <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/>.

OPS/OMS. Organización Panamericana de Salud. Acceso equitativo a los servicios básicos de salud: hacia una agenda regional por la Reforma del Sector Salud. Plan de Acción del Proyecto APAZVIF 1997. San José Costa Rica. <http://www.who.int/peh-emf/research/agenda/es/index.html>.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão MD, Santos VR. *In vitro* antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med.*, 2010 Sep 22.

Pérez-Castorena AL, Ruth FO, Alma RV, Mahinda M, Emma M. 2006. Labdanes and Withanolides from *Physalis coztomatl*. *Journal of Natural Products* 69: 1029-1033.

Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Commun Dentist Oral Epidemiol.*, 2003. 31:3-24.

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. World Health Organ.*, 2005. 83: 661-669.

Pushpam K., Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Curr .Sci.*, 2004. 86: 930-937.

Pontón, J., Moragues MD, Gené J. Guarro J. Quindóz G. *Candida albicans*. En: Hongos y actinomicetos alergénicos *Revista Iberoamericana de Micología*, 2002. pp. 25-26.

Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J. Appl. Microbiol.*, 2006. 101: 487-495.

Ramos F, Weintraub J, Gansky S, Hoover C, Featherstone J. Bacterial, behavioral, and environmental factors associated with early childhood caries. *J. Clin Pediatr. Dent.*, 2002. 26: 165–173.

Ravaschino E. Diseño racional de drogas: en busca de la droga ideal. *Revista Química Viva*- Número 3, año 6, diciembre 2007. Buenos Aires.

Reid RG, Sarker SD. 2006. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. In: *Methods in Biotechnology*, Vol. 20, Natural Products Isolation, Second edition; Sarker SD, Latif Z and Gray AI. (eds.). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp. 117-157.

Romero M. Estudio del efecto antiséptico y antiinfeccioso de la *Matricaria recutita* “manzanilla”, *Revista latinoamericana de ortodoncia y Odontopediatria Venezuela* 2008 6(24) jun. disponible en: www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp.

Romo de Vivar A. 1985 *Productos Naturales de la flora mexicana*. 1ª edición LIMUSA. México. Pp. 7-209.

Saeki Y, Ito Y, Shibata M, Sato Y, Okuda K, Takazoe I. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*, 1989. 30: 129–35.

Samaranayake LP, Macfarlane TW. *Oral Candidiasis*. London, Butterworth & Co, 1990.

Sampaio FC, Pereira V, Dias S, Costa O, Conde N, Busalaf M. *In vitro* antimicrobial of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J Ethnopharmacol*, 2009. 194: 289-294.

Schultes RE. The kingdom of plants. *En*: Thomson, W.A.E. (Ed). Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co., New York. 1978. pp 208.

Seidel V. 2006. Initial and Bulk extraction. In: Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation, Second edition; Sarker SD, Latif Z and Gray AI. (eds.). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp. 27-46.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. 2005. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc: New York, pp. 1-13, 117-176.

Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontol.*, 1986. 13: 570-577.

Smith C. U. 1975 Biología molecular Enfoque estructural 2ª edición Editorial Alianza pp. 243-24.

Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, Van Houte J. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Periodontal Res.*, 1977. 12(2): 90-106.

Söderling E, Isokangas P, Pienihäkkinen K, Tenovou J. Influence of maternal xylitol consumption on mother child transmission of *mutans streptococci*: 6 year follow up. *Caries Research*, 2001. 35: 173-177.

Spainhour CB. 2005. Natural Products. In: Drug Discovery Handbook; Gad SC (ed.). John Wiley & Sons Inc.: USA, pp 11-72.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:231-41.

Tian-Shung W, Li-Shian S, Jhi-Joung W, Song-Chou I, Hsien-Chang C, Yuh-Pan C, Yao-Haur K, Ya-Ling C, Che-Ming T. 2003. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 50:171-178.

Van den Berg, ME. Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático / M E van den Berg.- 2 ed. Rev. Eaum.- Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 1993. Pp 3.4

Vidal A, Fallarero A, Pena BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela PM. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol.* 2003. 89 (2-3): 295-300.

Villalba-Caloca J, Espinosa M, Sansores RH. Clínicas de Tabaquismo. *Rev. INER.*, 2000. 12(2): 83-86.

Villalba-Caloca J. 2000. La Medicina Tradicional. México. INER. 150 pp.

Whiley R, Beighton D. 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, 13: 195-216.

Williams R. Medical progress: Periodontal disease. *N. Engl. J. Med.*, 1990. 332: 373-382.

Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromon gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000*, 1999. 20: 239-288.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin. Periodontol.*, 1985. 12: 1-20.

Zambrana T. Beneficios de la fitoterapia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2005.
10 (2).

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Marcela Alejandra Gloria Garza

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

Tesis: “EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS Y CHALEPENSINA DE *Ruta chalepensis* L. (RUDA) CONTRA *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans*”

Campo de estudio: Microbiología

- Datos personales: Nacida el 05 de abril de 1980 en Monterrey, Nuevo León , hija de Genaro Gloria Juárez + y Blanca Esther Garza Sepúlveda.
- Educación. **Cirujano Dentista**. Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Cédula profesional: 4381553.
Maestra en Salud Pública. Facultad de Salud Pública y Nutrición. Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Cédula profesional: 5577632.
Título de tesis: “ Transmisión de *Streptococcus mutans* en el binomio madre-hijo”.

Experiencia Profesional.

- Subcoordinación de la Maestría en Odontología Avanzada de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (2007-2011).
- Profesor de medio tiempo de la cátedra de Control Sanitario de los alimentos del 2ª semestre de la carrera de la Licenciatura en Nutrición de la Facultad de Nutrición y Salud Pública de la Universidad Autónoma de Nuevo León (2008-2012)
- Docente Asociado A.T.C. de la cátedra de Microbiología oral del 2º semestre, Operatoria Dental Clínica III del 6º semestre, Epidemiología bucal del 8º semestre y Metodología Científica del 9º semestre de la carrera de Cirujano dentista de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (2010 a la fecha).
- Coordinación de Ciencias Clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (2012 a la fecha).
- Auditor del Consejo de Salubridad General. (2012 a la fecha).

Artículos Publicados.

- **Marcela A. Gloria-Garza¹, Ricardo Gomez-Flores¹, Myriam A. De la Garza-Ramos², Ramiro Quintanilla-Licea³, Reyes Tamez-Guerra¹, Patricia Tamez-Guerra¹ and Cristina Rodríguez-Padilla.**2013 *In vitro* antimicrobial activity of Ruta chalepensis metanol extracts against the cariogenic *Streptococcus mutans*. (African Journal of Microbiology Research)

Patente

- Uso de un extracto de *Ruta chalepensis* para el control de *Streptococcus mutans*. Fecha: 17/DIC/2012. Folio: MX/e/2012/092337.
- Uso de un compuesto aislado de *Ruta chalepensis* como agente bactericida contra *Streptococcus mutans*. Fecha: 20/FEB/2013. Folio: MX/a/2015/017693

Full Length Research Paper

In vitro* antimicrobial activity of *Ruta chalepensis* methanol extracts against the cariogenic *Streptococcus mutans

Marcela A. Gloria-Garza¹, Ricardo Gomez-Flores^{1*}, Myriam A. De La Garza-Ramos², Ramiro Quintanilla-Licea³, Reyes Tamez-Guerra¹, Patricia Tamez-Guerra¹ and Cristina Rodríguez-Padilla¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

³Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, Monterrey, N. L., México.

Accepted 28 October, 2013

Medicinal plants have been used for centuries and have become part of complementary medicine worldwide because of their potential health benefits. Since dental caries is one of the most common oral diseases and is considered a major public health problem, the present study evaluated *in vitro* antimicrobial potential of methanol extracts of *Ruta chalepensis* against the major etiologic agent of dental caries, *Streptococcus mutans*. The antimicrobial effect of *R. chalepensis* was evaluated in liquid medium by the dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction colorimetric assay and in solid medium by the determination of colony forming units (CFU). We found that the minimum inhibitory concentration (MIC) was 250 µg/mL ($p < 0.05$) in liquid medium and 3.9 µg/mL ($p < 0.05$) in solid medium.

Key words: Antimicrobial agents, plant extracts, *Ruta chalepensis*, dental caries, *Streptococcus mutans*.

INTRODUCTION

Infectious diseases represent a critical problem to health and they are one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. The importance of plants to modern medicine is recognized; for a long time, natural remedies and medicinal plants were the main or even the only resource for the physicians. For all cultures and in all times, medicinal plants have been used as the basis of their own medicine (Nuñez, 1982). Among the many diseases afflicting the world's population, infections, both bacterial and fungal diseases with inflammatory processes, which in some cases incapacitate the sufferer, represent a major group (Drusano, 2004). There are several plants of the Mexican medicinal plants that exhibit antimicrobial activities and are used in treating various

human diseases such as burns, diabetes, anti-inflammatory, skin diseases and hypertension (Pushpam, 2004).

Oral diseases are still a major health problem worldwide (Petersen et al., 2005). Problems such as oropharyngeal cancer and soft tissue injuries are considered as oral health problems, however, dental caries and periodontal disease are considered the most important ones (Petersen, 2003). Dental caries is a transmissible infectious disease that remains as a major public health problem in many developing countries and disadvantaged populations of developed countries (Mattos et al., 1998).

Streptococcus mutans is considered one of the main

etiological agents of dental caries. The World Health Organization (WHO) estimates that five billion people worldwide suffer from tooth decay, which affects 60 to 90% of the school population and the vast majority of adults in developed countries. In Mexico it is estimated that 44% of the population have cavities or oral diseases that affect their health (Petersen, 2003).

In the present study, leaf methanol extracts of *Ruta chalepensis*, a plant of the Rutaceae family, was tested on *St. mutans* growth, the major etiologic agent of dental caries, which might be important for the development of alternative treatments in dental health.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *Ruta chalepensis* leaf methanol extract

R. chalepensis leaves were collected in the city of Aramberri in the State of Nuevo Leon, Mexico (Latitude: 24° 06' 05" N, Longitude: 99° 51' 19" W), they were rinsed to remove traces of dust and insects material, and allowed to dry at 37°C for five days; then the plant material was pulverized and stored in 50-mL Falcon tubes. Five grams of pulverized material were transferred to a 10 x 10 cm gauze and a pouch was formed, securing it with a wire to the rim of a beaker where 80 ml of methanol were placed, which were in contact with the pulverized leaves in the gauze. The methanol extraction was facilitated by stirring with a magnetic bar in a magnetic stirrer (Laboratory Stirrer PC-410, Corning, NY), and allowed to mix for 24 h at room temperature. One milliliter of the extract was distributed in Eppendorf tubes, previously weighed, and then they were dried in a vacuum concentrator (CentriVap Desiccator Labconco) for 4 h. Extracts were dissolved in culture medium and adjusted to experimental concentrations.

Effect of *R. chalepensis* methanol extract on *S. mutans* growth

Fifty microliters of 1×10^3 *S. mutans* bacteria/ml suspensions were plated in brain heart infusion broth (BHI) medium (Remel, Lenexa, KS), in flat-bottomed 96-well plates (Corning Incorporated, Corning, NY), in the presence or absence of serial dilutions (1:2) of 50 µl of *R. chalepensis* methanol extract, antibiotic control (1 µg/ml tetracycline), plant extract free-methanol vehicle control and culture medium (vehicle control was similarly processed as with plant methanol extractions, but without plant material). Plates were then incubated for 6 h at 37°C, after which the tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added to all wells at a final concentration of 0.5 mg/ml in saline solution, and plates were incubated for 4 additional hours. At the end of the incubation period, 50 µl of extraction buffer [this buffer was prepared by dissolving 20% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS) at 37°C in a solution of 50% each N,N-dimethylformamide (DMF) and demineralized water, and the pH was adjusted to 4.7 (SDS and DMF were purchased from Sigma-Aldrich)] were added to all wells and plates were incubated for 16 h at 37°C (Yamato IC600 incubator); optical densities resulting from dissolved formazan crystals were then read in a microplate reader (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) at 570 nm (Gomez-Flores et al., 1995). In regard to CFU determination, 50 µl of 1×10^3 *S. mutans* bacteria/ml suspensions were plated in BHI broth medium, in flat-bottomed 96-well plates (Corning Incorporated), in the presence or absence of serial dilutions (1:2) of the *R. chalepensis* methanol extract (50 µl), antibiotic control (3 mg/ml tetracycline), and vehicle controls (methanol and culture medium);

the vehicle controls were similarly processed as with plant methanol extractions, but without plant material, similarly as mentioned above. Then, 1:10,000 dilutions were prepared from the wells and 100 µl were plated on BHI agar plates (Becton Dickinson, Mexico, D.F.) using sterile bent glass rods. Agar plates were then incubated at 37°C for 24 h and colonies were counted in a colony counter (ULB-100, Lightbox 37864-2000, Scienceware BEL-ART products, Pequannock, NJ) (Kansal et al., 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Inhibition of *Streptococcus mutans* growth by *Ruta chalepensis* methanol extracts

R. chalepensis methanol extract showed MICs of 250 µg/ml and 3.9 µg/ml, and induced a maximum of 63 and 94% growth inhibition against *S. mutans*, as measured by the MTT reduction (Figure 1a) and CFU methods, respectively (Figure 1b), whereas the vehicle control and medium alone (both free from plant extract) did not alter bacterial growth (data not shown). Medicinal plants have become part of alternative medicine worldwide because of their potential health benefits. These plants can be consumed or directly applied to treat infections (Rojas et al., 2006). Compounds synthesized by plants have a wide therapeutic potential due to their chemical constituents, for which the evaluation of their biological activity is important to develop new and alternative products with pharmacological potential and to validate treatments traditionally used by the Mexican population and other people from developing countries (Rodriguez-Fragoso, 2008).

Because of the increasing resistance of many pathogens to common therapeutic agents used today, such as antibiotics and antiviral agents, there is a renewed interest in the discovery of new compounds to treat systemic and oral diseases (Chinedum, 2005; Moreillon, 2000; Russell, 2000). Plant antimicrobials are not commonly used in a health program because of their low activity, unless their MICs are in the range of 0.1 to 1 mg/ml (Drusano, 2004); thus, the results of the present study may be an indication of an important antibiotic activity of *R. chalepensis* extracts.

Dental caries, periodontal disease, and tooth loss affect most of the population and can alter overall health. The value of medicinal plants to treat cariogenic bacteria is well known (Ramakrishna et al., 2011) and antimicrobial phytochemicals capable to treat oral diseases have been reported by many. In this regard, allicin from garlic has been shown to have antimicrobial activity against oral bacteria such as *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces oris*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* (Bachrach et al., 2011). In addition, compounds such as oleanolic acid, oleanolic aldehyde, linoleic acid, linolenic acid, betulin, betulinic acid, 5-(hydroxymethyl)-2-furfural, rutin, beta-sitosterol, and beta-sitosterol glucoside from raisins were shown to suppress *in vitro* adherence of *S. mutans* biofilm (Wu, 2009). Furthermore, *Dryopteris*

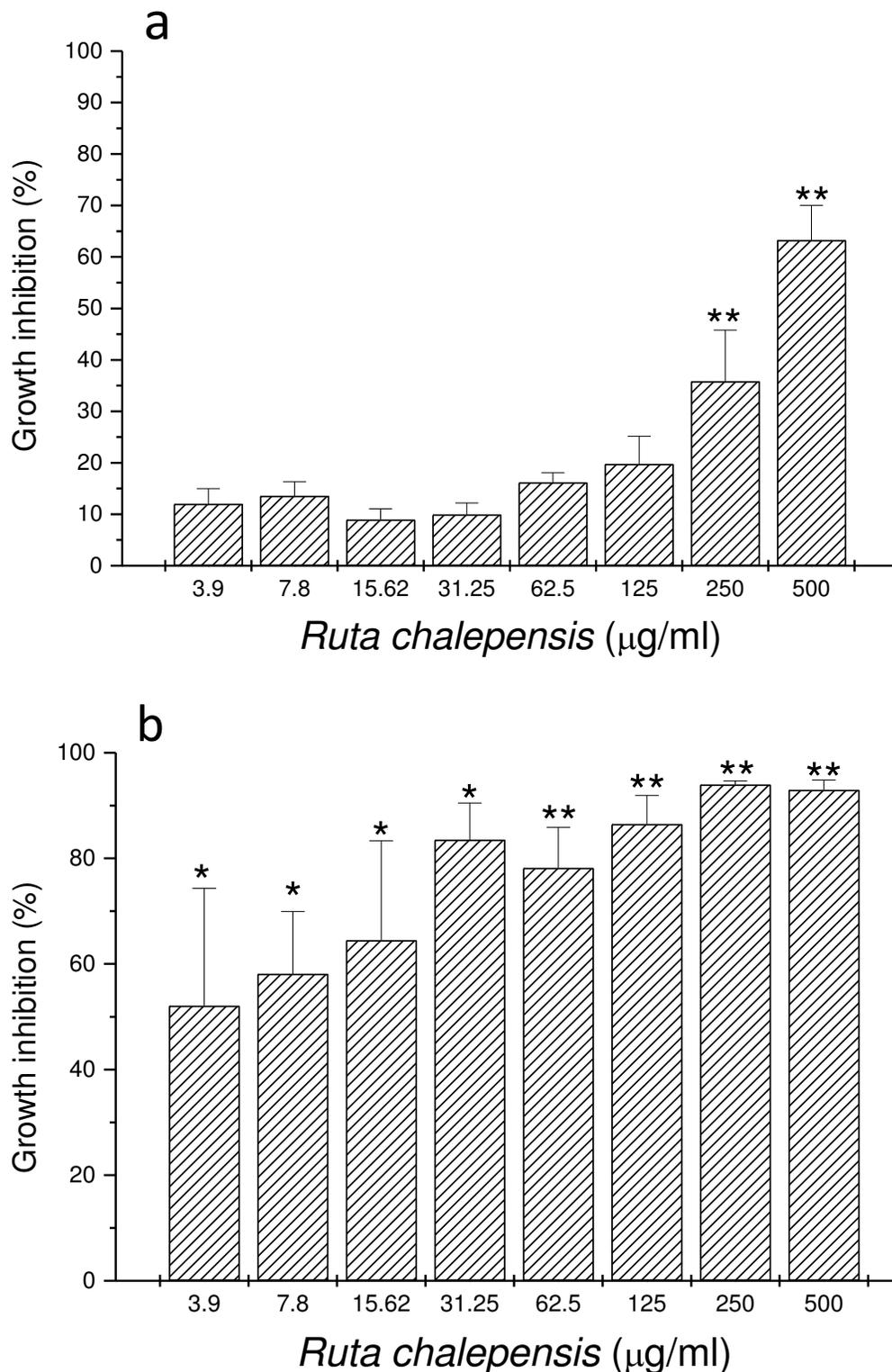


Figure 1. Antimicrobial effect of *R. chalepensis* leaves methanol extract on *S. mutans* (ATCC UA130 serotype *c*) growth. *S. mutans* culture suspensions (1×10^3 bacteria/ml) were incubated in the presence or absence of various concentrations of *R. chalepensis* methanol extract, after which growth was measured by the MTT reduction (*a*) and CFU (*b*) methods. Data represent means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ when compared with *R. chalepensis* extract-untreated control. Optical density at 570 nm for untreated cells was 0.59 ± 0.05 for the MTT reduction technique, whereas CFU control value for untreated cells was $5.8 \times 10^8 \pm 68 \times 10^6$.

crassirhizoma and *Aloe vera* extracts were reported to have bactericidal and bacteriostatic activity against *S. mutans* (Ban et al., 2012; Fani and Kohanteb, 2012),

To our knowledge, this is the first report showing that *R. chalepensis* methanol extracts inhibit *S. mutans* growth *in vitro*. There are still a number of plant compounds that remain to be evaluated at the molecular, cellular and physiological levels for their potential to treat human diseases.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Programa de Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) of the Universidad Autónoma de Nuevo León, México to RGF.

REFERENCES

- Bachrach G, Jamil A, Naor R, Tal G, Ludmer Z, Steinberg D (2011). Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *J. Med. Food*. 14: 1338-43.
- Ban SH, Kim JE, Pandit S, Jeon JG (2012). Influences of *Dryopteris crassirhizoma* extract on the viability, growth and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Molecules* 2017: 9231-44.
- Chinedum IE (2005). Microbial resistance to antibiotics. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 1606-11.
- Drusano GL (2004). Antimicrobial pharmacodynamics: Critical interactions of "bug and drug". *Nat. Rev.* 2: 289-300.
- Fani M, Kohanteb J (2012). Inhibitory activity of *Aloe vera* gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J. Oral Sci.* 54: 15-21.
- Gomez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta RT (1995). Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1842-46.
- Kansal R, Gomez-Flores R, Mehta RT (1997). Therapeutic efficacy of liposomal clofazimine against *Mycobacterium avium* complex (MAC) in mice depends on size of initial inoculum and duration of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 17-23.
- Mattos R, Zelante F, Line R, Mayer M (1998). Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res.* 32: 319-23.
- Moreillon P (2000). Means of bacterial resistance. *Rev. Med. Suisse Romande* 120: 641-50.
- Núñez ME (1982). Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore, Editorial Universidad de Costa Rica. p. 318.
- Petersen PE (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Commun. Dentist Oral Epidemiol.* 31: 3-24.
- Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. World Health Org.* 83: 661-9.
- Pushpam K (2004). Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Curr. Sci.* 86: 930-7.
- Ramakrishna Y, Goda H, Baliga MS, Munshi AK (2011). Decreasing cariogenic bacteria with a natural, alternative prevention therapy utilizing phytochemistry (plant extracts). *J. Clin. Pediatr. Dent.* 36: 55-63.
- Rodriguez-Fragoso L, Reyes-Esparza J, Burchielb S, Herrera-Ruiza D, Torres E (2008). Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227: 125-35.
- Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Muñoz JF (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Compl. Altern. Med.* 6: 2.
- Russell AD (2000). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92: 121S-35S.
- Wu CD (2009). Grape products and oral health. *J. Nutr.* 139:1818S-23S.