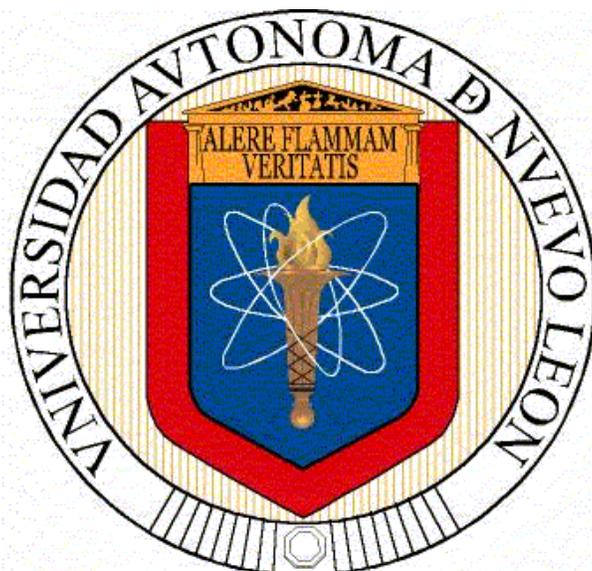


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**EFICACIA ANTIMICROBIANA DE *FLUORENSIA*  
*CERNUA* CONTRA BACTERIAS  
PERIODONTOPATÓGENAS Y EVALUACIÓN DE  
MUTAGENICIDAD Y CITOTOXICIDAD *IN VITRO***

**POR:**

**YAZMÍN JANETH LILIÁN MONTEMAYOR VILLARREAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON  
ESPECIALIDAD EN PERIODONCIA**

**DICIEMBRE 2015**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EFICACIA ANTIMICROBIANA DE *FLUORENSIA*  
*CERNUA* CONTRA BACTERIAS  
PERIODONTOPATÓGENAS Y EVALUACIÓN DE  
MUTAGENICIDAD Y CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

POR  
C.D YAZMÍN JANETH LILIÁN MONTEMAYOR  
VILLARREAL

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON  
ESPECIALIDAD EN PERIODONCIA

Monterrey, N.L Diciembre 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EFICACIA ANTIMICROBIANA DE *FLUORENSIA CERNUA*  
CONTRA BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS Y  
EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD Y CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Por

C.D Yazmín Janeth Lilián Montemayor Villarreal

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL; Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología, UANL y en la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL.

---

Dra. Gloria Martínez de Zambrano  
Director de Tesis

---

Dra Myriam Angélica de la Garza Ramos  
Co-director de Tesis

---

Dra Azucena Oranday Cárdenas  
Asesor Externo

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño  
Asesor Externo

*“Los sueños parecen  
al principio imposibles,  
luego, improbables,  
y después; cuando  
Nos comprometemos,  
se vuelven Inevitables”*

***Mahatma Gandhi***

*“Haz tu mejor esfuerzo  
en las cosas que  
mejor haces,  
y sabrás en tu alma  
que eres el éxito  
más grande del mundo.”*

***Og Mandino***

## DEDICATORIA

*A Dios:*

Por darme la vida y brindarme la oportunidad de vivir estos momentos de dicha y felicidad; por permitirme llegar a ser lo que hoy soy. Por acompañarme siempre en cada momento de mi vida, por guiarme y llenarme de tantas bendiciones, más de las que pude imaginar; por tu amor infinito.

*A mis padres:*

Dr. Pedro Alfonso Montemayor González y Alma Doris Yazmín Villarreal Báez, quienes me brindaron la oportunidad de siempre estudiar en las mejores instituciones, porque siempre me han dicho que la mejor herencia es la educación.

Gracias por su tenacidad y ejemplo; por forjar en mí valores que modelan mi personalidad, por enseñarme a luchar y nunca darme por vencida: "Pues no es más grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se da por vencido".

Gracias por su apoyo incondicional en mis aciertos y en mis errores; por su comprensión en mis momentos de inmadurez, por sus sabios consejos que siempre me guiaron y animaron a seguir caminando hacia adelante. Gracias por escuchar con atención mis preocupaciones, temores, angustias y alegrías. Pero sobretodo, gracias por que siempre tuvieron fe y confianza en mí.

Se que la vida está llena de logros y pequeñas metas que alcanzar, pero se debe tener muy presente que nuestro paso debe dejar huella y ustedes me lo han enseñado y demostrado: muchas gracias! Los quiero infinitamente!

*A mi hermana:*

Doris Anahí Montemayor Villarreal por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional, por sus sabios consejos y el ánimo que siempre infundó en mí para seguir adelante. Por ser mi mejor amiga, mi confidente; por ayudarme en cada momento. Por darme alegría en cada instante y por ser mi luz siempre.

*A mi abuelita:*

Elda Aurora González Galván: gracias por su constante preocupación en el avance de esta investigación, por estar a mi lado alentándome a salir adelante sin importar los obstáculos que se presenten. Por su amor y cariño invaluable.

*A mis familiares:*

Por siempre apoyarme, por su cariño hacia mí, por cada muestra de su amor, de interés por mi superación. Por creer en mí siempre.

*A mis amigos:*

A todos aquellos que siempre mostraron interés por el avance en mi tesis y me alentaron a continuar; por estar conmigo dándome ánimos y apoyándome siempre. Por el invaluable tesoro que representan para mí.

## AGRADECIMIENTOS

*Dra. Gloria Martínez Sandoval* gracias por su humildad y entera disposición para ayudarme desde un principio con mi investigación, por el tiempo que me dedicó, por su valiosa entrega, apoyo, generosidad y amabilidad desde que la he conocido en el posgrado.

*Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos* por que inciamos ya hace años la primera línea de investigación con plantas en la Facultad, por las personas que me presentó en Ciencias Biológicas, por seguir con entusiasmo apoyando, por la paciencia y el tiempo invertido en mí. Por mantener siempre las puertas abiertas del CIDICS de la Unidad de Odontología Integral.

*Dra. Azucena Oranday Cárdenas* gracias por sus sabios consejos, su paciencia y su disposición para ayudarme en la elaboración de esta tesis. Por mantener siempre esa sonrisa que la caracteriza. Porque por usted hace años inicie en esta línea de investigación, por incentivar en mí la semilla de perseverar.

*Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño* gracias por la ayuda en la prueba de citotoxicidad con los fibroblastos, sus recomendaciones y sabios consejos.

*Dra Marianela Garza Enriquez* gracias por todo el tiempo compartido, por sus sabios consejos tanto en la clínica como en la vida diaria, por su gran interés y apoyo para que continuara con mi investigación. Por la paciencia mostrada ante mis dudas, por su invaluable ayuda y por ser ejemplo para mí de gran liderazgo, pasión y entrega en todo lo que realiza.

*Dr. Eloy Cárdenas Estrada*, por su amabilidad, paciencia y ayuda para el análisis estadístico de esta investigación, por siempre mostrar con una sonrisa los resultados y brindarme su asesoría invaluable.

*Q.B.P. Vilma Rosa Suárez Martínez* gracias por su linda compañía en el laboratorio de la Facultad, su interés sincero en la investigación, su ayuda constante y entera disposición para ayudarme y darme palabras de aliento.

## TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN	Página
AGRADECIMIENTOS .....	VI
LISTA DE IMÁGENES .....	XI
LISTA DE TABLAS .....	XII
LISTA DE GRÁFICAS .....	XIII
LISTA DE NOMENCLATURAS .....	XIV
RESUMEN .....	XV
ABSTRACT .....	XVI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	7
3. OBJETIVOS .....	8
3.1 Objetivo general .....	8
3.2 Objetivos específicos .....	8
4. ANTECEDENTES .....	9
4.1 Enfermedad periodontal .....	9
4.1.1 Antecedentes históricos .....	9
4.1.2 Definición .....	9

4.1.3 Clasificación de las enfermedades .....	10
4.1.4 Etiología .....	11
4.1.5 Biofilm morfología y formación .....	12
4.1.6 Clasificación de la placa .....	13
4.1.7 Hipótesis de la placa dental .....	13
4.1.8 Patógenos periodontales .....	15
• <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	15
• <i>Tanerella forsythia</i> .....	19
• <i>Streptococcus intermedius</i> .....	20
4.1.9 Complicaciones sistémicas de la periodontitis .....	22
4.1.10 Control microbiológico de la placa .....	27
• Clorhexidina .....	28
4.2 Fitoterapia .....	29
4.2.1 Concepto .....	32
4.2.2 Planta de estudio	
4.2.2.1 <i>Fluorensia Cernua</i> .....	33
4.3 Investigaciones existentes .....	35
4.4 Mutagenicidad	
4.4.1 Prueba de Ames .....	39
4.5 Citotoxicidad	
4.5.1 Rojo Neutro .....	43
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1 Material vegetal .....	46

5.11 Obtención del material vegetal .....	46
5.12 Preparación del material vegetal .....	46
5.13 Realización del extracto .....	47
5.2 Material microbiológico .....	48
5.21 Obtención del material microbiológico.....	48
5.22 Activación de las cepas.....	49
5.23 Cultivo de bacterias .....	50
5.24 Evaluación de actividad antimicrobiana .....	51
5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria ....	52
5.4 Evaluación de la mutagenicidad .....	61
5.5 Evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos .....	63
6. RESULTADOS .....	75
6.1. Concentración mínima inhibitoria .....	75
6.2 Prueba de Ames .....	76
6.3 Ensayo de Rojo neutro .....	77
7. DISCUSIÓN .....	80
8. CONCLUSIONES .....	83
9. RECOMENDACIONES .....	85
10. LITERATURA CITADA.....	86
11. APÉNDICES .....	89

## LISTA DE IMÁGENES

No.	FIGURA	Página
I	Imagen al microscopio del Biofilm oral	13
II	Imagen a microscopio de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	19
III	Imagen a microscopio de <i>Tanerella forsythia</i>	21
IV	Imagen a microscopio de <i>Streptococcus intermedius</i>	23

## LISTA DE TABLAS

No.	TABLA	Página
I	Bacterias asociadas a la periodontitis	15
II	Material vegetal empleado	46
III	Tabla del conteo total bacteriano estándar	51
IV	Escala de MacFarland	54
V	Tabla de porcentaje de viabilidad celular	71

## LISTA DE GRÁFICAS

No.	GRÁFICA	Página
1.	Concentración mínima inhibitoria para <i>Porphyromonas gingivalis</i>	74
2.	Concentración mínima inhibitoria para <i>Tanerella forsythia</i>	74
3.	Concentración mínima inhibitoria para <i>Sterptococcus intermedius</i>	75
4.	Prueba de Ames de mutagenicidad	76
5.	Porcentaje de viabiliadd celular en la Prueba de Rojo neutro	77
6.	Conteo celular en la prueba de citotoxicidad de <i>F. cernua</i> contra clorhexidina	78

## NOMENCLATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µl	Microlitro
®	Marca registrada
Abs	Absorbancia
ATCC	American Type Culture Collection
Cel	Células
Cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
D	Días
DMSO	Dimetilsulfóxido (CH <sub>3</sub> SOCH <sub>3</sub> )
G	Gramos
H	Horas
Min	Minutos
mM	Milimolar
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Federal Drug Administration
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## RESUMEN

La enfermedad periodontal se considera el padecimiento bucal más importante en la edad adulta debido a su alta prevalencia a nivel mundial y el mayor responsable de la pérdida de piezas dentales. Es un padecimiento crónico inflamatorio provocado por bacterias subgingivales anaerobias denominadas periodontopatógenas; que causan la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción ósea; además de estar vinculadas con otras enfermedades sistémicas como: aterosclerosis, lesiones coronarias, enfermedades pulmonares, partos prematuros o de bajo peso al nacer y artritis.

El objetivo de este estudio es analizar el potencial de *Fluorensia cernua* (Hojasén) como antimicrobiano de acción tópica directa contra las bacterias periodontales *in vitro*.

Se realizó el extracto mediante la técnica de maceración constante empleando el metanol como solvente, y posterior extracción y se diluyó como colutorio a una concentración del 0.12% para compararlo con la clorhexidina existente actualmente en el mercado. Se evaluó por el método de difusión en placa el halo de inhibición contra las bacterias, así mismo se determinó la concentración mínima inhibitoria (120. µg/ml) mediante el método de microdilución. También se realizó la prueba de Ames para evaluar posibles efectos de mutación genética o carcinógenos obteniendo resultados negativos y se realizó la prueba de citotoxicidad del extracto frente a fibroblastos humanos con la técnica de rojo neutro descartando toxicidad alguna al obtener 98.83% de viabilidad celular, que al compararlo con la clorhexidina esta sí muestra citotoxicidad obteniendo 76.26% de viabilidad celular.

Con este estudio se concluye que el extracto de *Fluorensia cernua* contra bacterias periodontopatógenas se considera una alternativa eficaz, de bajo costo y segura para su empleo en estudios clínicos futuros que promuevan la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal.

## ABSTRACT

Periodontal disease is considered the most important in adulthood due to its high prevalence worldwide and largely responsible for the loss of teeth mouth.

It is a chronic inflammatory disease caused by subgingival anaerobic bacteria named periodontopathogenic causing the destruction of connective tissue and bone resorption; besides being linked to other systemic diseases as atherosclerosis, coronary lesions, rheumatoid arthritis, premature birth or low birth weight .

In this study was analyzed the potential for using *Fluorensia cernua* (*Hojasén*) plant as direct topical antimicrobial agent against periodontal bacteria and thus contribute to the prevention and treatment of this pathology.

The extract was performed by the technique of constant maceration using methanol as solvent, and subsequent extraction, performance was obtained and diluted as a mouthrinse at a concentration of 0.12%.

Was evaluated by the plate diffusion method the halo of inhibition against bacteria, likewise the minimum inhibitory concentration (120 µg/ml) was determined by the microdilution method. Also the Ames test was conducted to evaluate possible toxic laboratory; genetic mutation or cancerigen effects obtainig negative results. Finally cytotoxicity test of the extract was performed against human fibroblasts with neutral red assay yielding negative results. Celular viabiity with the extract was 98.83% compared with chlorhexidine that was 76.26%

This study concludes that *Flurensia cernua* (*Hojasen*) against periodontal pathogenic bacteria is an effective and safe alternative for use in futures clinical studies for the prevention and treatment of periodontal disesease.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es el padecimiento más importante en el ámbito odontológico después de la caries, debido a su alta prevalencia a nivel mundial. Surge por la extensión de la inflamación causada en la encía, debido a acumulación de placa en la zona dentogingival, hacia los tejidos de protección y soporte dentario: cemento radicular, ligamento periodontal, hueso alveolar y encía (Berns, 1993; Marsh PD, 2005)

Esto, da por resultado, la migración apical del epitelio de unión, cuya función es sellar la inserción de la encía en el diente y actuar como barrera de protección contra los microorganismos orales; dando por consecuencia un fácil acceso para las bacterias hacia el surco gingival profundizándolo de manera patológica y originando la bolsa periodontal, para finalmente dar lugar a la pérdida de inserción del diente hacia el hueso. (Berezow, 2011)

Numerosos estudios aseguran que los causantes de esta enfermedad son ciertos microorganismos de la placa bacteriana que se encuentran presentes de manera elevada en los sitios activos de las lesiones; por lo que han sido denominados periodontopatógenos. Para prevenir la enfermedad periodontal, se requiere la completa eliminación de éstos. (Socransky, 1994; 1998; Kumar 2003, Hafajee, 2008)

La enfermedad periodontal es destructiva por naturaleza, en su fase aguda es incapacitante y en su fase terminal puede culminar con la pérdida total de las piezas dentales.

El uso de agentes antimicrobianos locales, es necesario como coadyuvante en el tratamiento periodontal para reducir las bacterias causantes de la placa e inflamación gingival; así mismo son empleados para prevenir el aumento de dichos microorganismos equilibrando la flora bacteriana de manera preventiva, o bien, para evitar la recurrencia en pacientes en fase de mantenimiento; pero éstos son costosos, limitados en su eficacia y con numerosos efectos adversos. (Loesche, 1996; Marsh, 2000, 2005; Lang, 2008)

En nuestro país, es escasa la investigación realizada en epidemiología estomatológica, lo que ha provocado que la atención que se brinda en materia de salud pública sea restringida y sólo se enfoque a aspectos curativos descartando los preventivos, los cuales a largo plazo, podrían representar la solución a un problema que en México, podemos señalar amplio si consideramos la frecuencia con la que se informa para los dos padecimientos más comunes en odontología: la caries dental y la enfermedad periodontal cuyas frecuencias son del 95% y el 85% respectivamente. (Taboada, 2000)

Estas cifras, elaboradas en base a la población actual de más de 112 millones de habitantes según el Instituto Nacional de Estadística Geografía e

Informática (INEGI) del 2010, nos revelan que en nuestro país existen más de 70 millones de adultos con enfermedades periodontales.

De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), México se encuentra entre los países de alto rango de frecuencia de enfermedades estomatológicas. En 2010 informó que sólo una de cada diez personas posee la totalidad de sus dientes sanos y obturados.

Además, la pirámide poblacional de México se ha modificado con el paso de los años, ha experimentado un descenso gradual en la proporción de niños y jóvenes y un aumento progresivo en las personas adultas y de edad avanzada, debido a una declinación en las tasas de natalidad y mortalidad, por lo que hay que prestar especial atención a este grupo poblacional.

La enfermedad periodontal ocurre con mayor frecuencia en personas de edad madura y avanzada, lo que constituye un problema grave de salud, no sólo por su carácter mutilante, sino por las complicaciones sistémicas generales del paciente. Sin embargo, se ha reportado que esta entidad patológica se inicia desde la adolescencia. (Ainamo, 1992)

También, se ha reportado en investigaciones recientes, que la enfermedad periodontal está asociada con un mayor riesgo de enfermedades pulmonares, cardiovasculares, osteoporosis y partos prematuros de bajo peso al nacer, debido a los diversos componentes que las bacterias periodontopatógenas

producen en boca y que son liberados hacia el torrente sanguíneo. (Beck; Offenbacher, 1996; Beiker, 2011; Persson, 2012)

Las repercusiones de esta enfermedad son considerables y costosas: produce dolor, abscesos dentarios, dificultad al masticar, deterioro funcional, disminución de la calidad de vida, ausentismo laboral y pérdida de piezas.

Sin duda el problema es grave; ahora bien, si consideramos que de esos 112 millones de personas; sólo un pequeño porcentaje de ellos tiene acceso y recursos financieros a los programas existentes por la condición de estar asistidos socialmente tenemos que un gran sector de la población se encuentra desprotegido. (Inegi, 2010)

Se debe considerar también que en México y en muchos países existen pocos especialistas en periodoncia y que el tratamiento resulta costoso, razón por la cual los pacientes se ven limitados a requerir esos servicios para recuperar su salud bucal.

Por lo antes expuesto, es indudable que existe una gran necesidad de proponer alternativas en materia de salud bucal que puedan ofrecer no sólo posibilidades curativas, sino también preventivas con resultados favorables, accesibles y sin generar efectos adversos.

Recientemente, se ha prestado especial atención a la medicación naturista e investigaciones reportan que ciertas plantas poseen propiedades antimicrobianas. Esto, lleva a la propuesta del uso de plantas como una alternativa que puede representar la solución al problema periodontal; ya que las plantas constituyeron en épocas pasadas el principal medio por el cual nuestros antepasados conservaron o atendieron sus necesidades en materia de salud bucal. (Sánchez, 2000)

La búsqueda de nuevos antimicrobianos fue el objeto de estudio para analizar plantas que se les atribuyen propiedades antisépticas con el fin que puedan aplicarse en la odontología.

México, es un país cuya riqueza botánica debe ser aprovechada y considerada como un medio alternativo para el tratamiento estomatológico y para la prevención de la enfermedad periodontal.; además de lograr un mejor aprovechamiento de la flora y la vegetación de Nuevo León, así como proporcionar nuevas opciones en materias primas de bajo costo para la industria Químico-Farmacéutica.

En esta investigación se analizarán los beneficios del extracto de *Fluorensia cernua* (Hojasén) el cual mostró en estudio previo (Montemayor, 2004) buena actividad antimicrobiana contra dichas bacterias *in vitro*. Determinando su Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), para su empleo tópico, así como la

evaluación de mutagenicidad para evaluar que no cause alteraciones en los tejidos y Pruebas de Citotoxicidad *in vitro* que avalen la seguridad de su empleo para que sea aplicado en un futuro como colutorio antimicrobiano de acción tópica directa en la boca contribuyendo con ello a la prevención y tratamiento de esta enfermedad; además, de dar una nueva opción de efecto terapéutico con productos naturales propios del estado de Nuevo León no investigados hasta ahora y con resultados favorables y significativos, sin generar efectos adversos como los encontrados en los productos que actualmente son utilizados, tal es el caso de la clorhexidina, un agente antimicrobiano potencial pero con importantes efectos adversos como lo es la pigmentación marrón que ocasiona en los dientes y dorso de la lengua, hipersensibilidad, pérdida del sentido del gusto y su elevado costo.

La importancia de este trabajo radica en promover y aprovechar los recursos naturales que se encuentran en el estado de Nuevo León a través de la creación de nuevos agentes antimicrobianos vegetales de acción tópica directa con resultados significativos, favorables y sin efectos adversos sobre los tejidos blandos o efectos sistémicos a largo plazo y de menor costo que facilite a la población mexicana su adquisición y empleo.

## 2. HIPÓTESIS

El extracto de *Fluorensia cernua* puede ser aplicado como antimicrobiano tópico con resultados efectivos para la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal y sin generar toxicidad o alteración a los tejidos gingivales.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Determinar la efectividad de *Fluorensia cernua* como agente antimicrobiano tópico frente a bacterias periodontopatógenas tales como: *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius* y *Tanerrella forshytia* (*Bacteroides forsythus*) principales causantes de la enfermedad periodontal. Así mismo evaluar la mutagenicidad y citotoxicidad para tener la certeza que no genera daño ni alteraciones a los tejidos sanos.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de *Fluorensia cernua* frente a las bacterias periodontopatógenas *in vitro*.
- Analizar mediante pruebas de mutagenicidad si dicho extracto pudiera generar alteraciones en los tejidos después de un tiempo de exposición a dicho antimicrobiano.
- Demostrar que no genere daño a las células en los tejidos con el empleo tópico directo mediante la prueba de citotoxicidad a fibroblastos *in vitro*.
- Comparar la actividad antimicrobiana, citotóxica y mutagénica que posee el extracto de *Fluorensia cernua* contra la clorhexidina, principal agente tópico empleado actualmente.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 Enfermedad periodontal**

#### **4.1.1 Historia**

Las diversas formas de enfermedades gingivales y periodontales aquejan al ser humano desde comienzos de la historia. Registros como el Papiro de Ebers, Susruta samhinta y el Ya Kon de las grandes civilizaciones de Egipto, India y China respectivamente, revelan una conciencia de la enfermedad periodontal y la necesidad de atenderla a base de ciertas plantas medicinales. (Bascones, 2000)

#### **4.1.2 Definición**

La periodontitis se define como la infección bacteriana que produce inflamación de los tejidos de soporte del diente, habitualmente, un cambio progresivamente destructivo que lleva a la pérdida de hueso, cemento y ligamento periodontal e incluso a la pérdida de las piezas dentales debido a la extensión de esta inflamación de la encía hacia los tejidos del periodonto (Berns,1993)

### **4.1.3 Clasificación**

De acuerdo a la Asociación Americana de Periodoncia de 1999 se establece como las más frecuentes las inducidas por placa dentobacteriana.

#### **1. PERIODONTITIS DE COMIENZO PRECOZ O AGRESIVA**

Se caracteriza por acontecer en edades infantiles o adultos jóvenes, suele mostrar una evolución y pérdida ósea rápida y se vincula con cantidades escasas de placa y cálculo.

Es común encontrar alteraciones de la respuesta del huésped, destacando un déficit en la funcionalidad de los polimorfonucleares, lo cual justifica su grave y rápida evolución.

#### **2. PERIODONTITIS CRÓNICA O DEL ADULTO**

Constituye la mayor parte de las enfermedades periodontales, suele comenzar a partir de los 35 años, su evolución es lenta y progresar durante toda la vida del individuo a lo largo de varios años, con episodios de exacerbación y remisión. Está directamente relacionada con la presencia de placa y cálculo. (Haffejee, 1998)

Esta entidad patológica se considera la enfermedad crónica infecciosa más común en los seres humanos y ocupa el primer lugar como responsable de pérdida de piezas dentales en adultos después de la tercera década de la vida.

### **4.1.3 Etiología**

La salud del periodonto puede ser catalogada como un estado de equilibrio, en el cual la población de bacterias coexiste con el huésped sin causar daño en los tejidos. La ruptura de dicho equilibrio, motiva a alteraciones tanto en el huésped como en la biopelícula bacteriana actualmente denominado biofilm causando la destrucción de los tejidos de soporte. (Socransky, Haffajee, 2002)

Desde 1898 Green Vardiman Black acuñó el término de placa dental para referirse a los depósitos bacterianos, los cuales, están adheridos entre sí como biopelícula en una matriz compuesta por células epiteliales descamadas, leucocitos, productos derivados de las bacterias, saliva y exudado gingival. (Listgarden, 1987)

Experimentos clásicos demostraron que la acumulación de bacterias en los dientes induce de manera reproducible una respuesta inflamatoria en los tejidos gingivales. (Kowolik et al , 2001)

En 1 mm<sup>3</sup> de placa dental, que pesa aproximadamente 1 mg. están presentes más de 10<sup>8</sup> bacterias; y han sido aisladas más de 400 especies. (Kumar, 2003, Marsh 2011)

Según las OMS, el biofilm se define como un ecosistema bacteriano proliferante y enzimáticamente activo que se adhiere a las superficies inertes tanto biológicas como sintéticas.

#### **4.1.5 Biofilm**

La forma más característica es de champiñón con microcolonias bacterianas separadas de otras por medio de canales de agua, que permiten la distribución de nutrientes y la eliminación de metabolitos y residuos bacterianos, todo dentro de una matriz de polisacárido.

El proceso de formación del biofilm lleva cuatro fases:

- En la primera es de iniciación, se forma una película adhesiva en la superficie dental sucitada por el depósito de proteínas.
- En la segunda, es la de adhesión; donde bacterias iniciadoras se fijan a la película adquirida.
- La tercera etapa denominada de coadhesión; donde las bacterias iniciadoras segregan mediadores que facilitan a segundos colonizadores adherirse por receptores, creando diversidad de géneros bacterianos, así como también se inicia la formación de la matriz extracelular de polisacárido, primera barrera defensiva del biofilm.
- Finalmente en la cuarta fase, es la multiplicación de las bacterias y su maduración creando sistemas más complejos. (Marsh, 2011, 2009, Sockransky, 2002)



Imagen de Biofilm al microscopio electrónico

#### **4.1.6 Clasificación de la placa dental (Biofilm)**

##### **- Supragingival.**

Se extiende desde el margen libre de la encía hasta la corona del diente, acumulándose especialmente en el tercio gingival del diente, la saliva es la principal fuente de proteínas de esta placa.

##### **- Subgingival**

Se localiza por debajo del margen de la encía en el surco gingival o bolsa periodontal; que por su característica de saco, favorece la acumulación de bacterias por su difícil acceso; además, en esta región no hay oxígeno y su formación, se facilita ya que el pH del surco es más alcalino que el de la saliva. El líquido gingival es la fuente principal de proteínas de esta placa además de poseer mayor cantidad de sales minerales que al precipitarse favorece la calcificación de la placa dando origen al cálculo dental. (Marsh, 2000, 2009, Sockransky, 2002)

#### **4.1.7 Hipótesis de la Placa Dental**

En un principio, se supuso que existía una relación directa entre la cantidad total de bacterias acumuladas y la amplitud del efecto patogénico.

Se demostró, que la placa produce una diversidad de sustancias como ácidos, endotoxinas y antígenos que irritan y destruyen los tejidos de soporte. Se pensaba que las personas con enfermedad periodontal tenían una resistencia débil a la placa bacteriana en su conjunto y que su higiene era inadecuada; además, considera que todas las bacterias que configuran la placa están implicadas en el origen de la enfermedad periodontal, este punto es conocido como hipótesis de la placa inespecífica (Theilade, 1986).

La propensión de los tejidos inflamados a experimentar una destrucción tisular permanente se consideró más tarde de naturaleza específica, porque no todas las lesiones de gingivitis progresaban invariablemente hacia periodontitis. Se demostró que existía un número específico de especies bacterianas que se encontraban en cantidades elevadas en las lesiones periodontales y son los responsables de la enfermedad periodontal por lo que se les denominó periodontopatógenos, este punto es conocido como hipótesis de la placa específica (Loesche, 2001).

Esto sugiere que el desarrollo de la enfermedad periodontal requiere de un huésped susceptible y un aumento en la flora específica patogénica que consiste predominantemente en bacilos gram negativos anaerobios.

Recientemente se ha agregado la hipótesis ecológica (Marsh, 2003) donde establece que el pH juega un factor importante, las bacterias putativas generan ácidos que disminuyen el pH del ambiente oral y con ello crecen más bacterias periodontopatógenas.

#### 4.1.9 Patógenos Periodontales de estudio

En el siguiente cuadro se muestran las diversas especies bacterianas asociadas con la periodontitis:

<b>Ampliamente asociadas</b>	<b>Moderadamente asociadas</b>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Treponema denticola</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Eubacterium sp</i>
<i>Capnocytophaga sp.</i>	

- ***Porphyromonas gingivalis***

Microorganismo gram negativo, anaerobio estricto, no móvil que suele presentarse en forma de cocos o bacilos cortos y que mide 0.5-0.8 um por 1-3.5 um.

Pertenece al grupo *Bacteroides* de pigmentación negra, por formar colonias de color pardo a negras, y agrupados originalmente en una sola especie llamada *Bacteroides melaninogenicus* (Burton, 1928). En 1989, el género fue redefinido en 2 nuevos: *Porphyromonas* y *Prevotella*.

Con la aplicación de nuevas técnicas de identificación en biología molecular como el ADN –ADN hibridación y estudio de sus características bioquímicas, se pudo identificar un grupo homogéneo de especies. En el 2003, el genoma de esta especie pudo identificarse revelando 1990 lecturas de secuencias protéicas y estimando que al menos 463 genes son esenciales (Nelson 2003, Ramos, 2011).

Estudios iniciados a finales de los setentas han confirmado la asociación de esta bacteria con la periodontitis y demostraron que es poco común y en cantidades escasas en individuos sanos, por lo que se le considera patógeno exógeno. Esto es debido a las cifras porcentuales en las que se encuentra a esta especie, en un 80% está presente en pacientes con enfermedad periodontal y en un 20% o menos en individuos con salud periodontal. (Amano, 2003)

Posee a nivel de la membrana externa las endotoxinas, es un cocobacilo capsulado, no esporulado, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. A nivel superficial presenta vesículas que contienen variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia.

Los factores de virulencia que presenta son;

-La cápsula: constituida por polisacáridos, siendo un gen codificante de epimerasa *epsC* esencial para su síntesis. Esta juega un rol significativo en la evasión del sistema inmunológico del huésped, fagocitosis, opsonización y accionar del complemento. (Brunner, 1998)

- Endotoxina: presenta en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte central por el lípido A, que participa en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped, ocasionando inflamación gingival, asociada a a destrucción de tejido conectivo y la reabsorción de hueso alveolar por activación de los osteoclastos, causado además, liberación de prostaglandinas e incremento de IL18 e IL1B. (Lamont, 1998).

- Hemaglutininas: son proteínas codificadas con el gen *hag* (de la A –E) que promueven la colonización por mediación de la unión bacteriana a receptores oligosacáridos en células humanas.

- Fimbrias: presentes en forma períttrica de 0.3 a 3.0  $\mu$ m de largo y 5 nm de ancho, compuestos por monómeros de fimbrilina que le brindan la capacidad de unirse a diferentes sustratos, moléculas y células. Además de tener propiedades quimiotácticas y de inducción de citocinas que generan factores de invasión y virulencia.

Se dividen en fimbria mayor o fimbria larga, que ayuda a la adhesión inicial y organización del biofilm. La menor o corta, la cual es esencial para autoagregación entre más microorganismos y el reclutamiento para la formación de microcolonias, entre ellos *St. Gordonii* y *T. fosrythia*. Y las fibras accesorias, que son tres principalmente y sirven para unirse a las proteínas de la matriz extracelular.

- **Proteinasas cisteinproteasas:** son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral al huésped, degradando el colágeno de diferentes tipos, la matriz de metaloproteinasas y la fibronectina. Estas proteínas son llamadas gingipaínas que producen el 85% de la actividad proteolítica y el 100% de la actividad tipo tripsina. Degradan péptidos largos de la albúmina del huésped para obtener nitrógeno y carbón para sus funciones. Así mismo, degrada la transferrina para obtener hierro y continuar con sus funciones celulares completas.

Degrada también, fibronectina, fibrinógeno y las uniones de las células epiteliales; además de activar el sistema de coagulación y sistema calicreína-quinina. Adí mismo degradan IL8, impidiendo la reparación de tejido; llevando a la destrucción ósea y del tejido coectivo.

- **Proteinasas no cisteinproteasas:** estas son la colagensa, proteasa, hemaglutinina, una enzima tipo convertora de endoteina que degrada las proteínas desnaturalizadas y los polipéptidos.

- **Inductor de metaolproteinasas de la matriz:** no es un producto en sí generado por *P. gingivalis* pero sí lo induce para que sea producida por los

fibroblastos, leucocitos y macrófagos. Degradando colágena tipo I y fibronectina. (Holt, 2005).

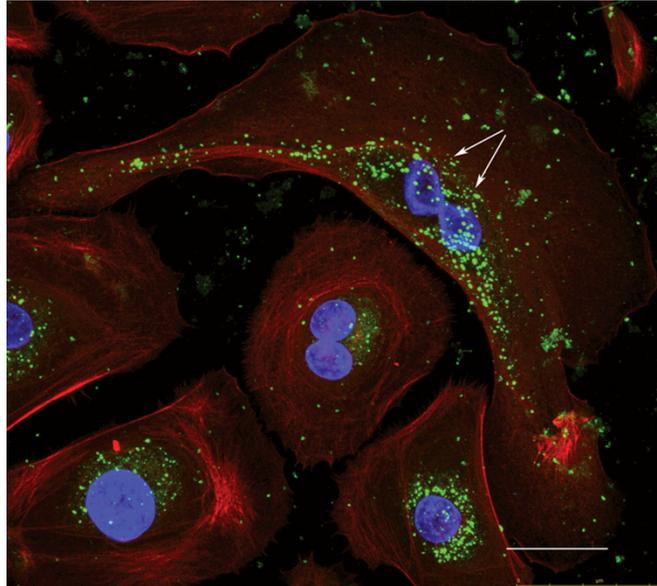


Imagen de inmunofluorescencia de *Porphyromonas gingivalis*

En estudios recientes se ha considerado a esta bacteria como potencial en la formación de placas ateromatosas, ya que es capaz de acceder al revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos e inducir la agregación plaquetaria. Además, datos preliminares en estudios realizados con ratones sugieren que origina lesiones cardíacas más grandes que los que no poseen este microorganismo, debido a que estimula la secreción pancreática de proteínas séricas. Así mismo está relacionada con la artritis reumatoide. (Beck, 1996)

- ***Tanerella forsythia***

Esta especie bacteriana fue descrita por primera vez como *Bacteroides fusiforme* en 1979 (Tanner y cols.). Es un bacilo gram negativo, anaerobio, fusiforme, muy pleomórfico. Posteriormente, se denominó *Bacteroides forsythus* y actualmente, por los cambios taxonómicos, se le ha denominado *Tanerella forsythensis* o *for sythia*. (Shan, et al, 1988)

Se demostró, que el desarrollo de este microorganismo puede mejorar con el cocultivo de *F. nucleatum* y, de hecho, es común que se presenten juntos en sitios subgingivales (Socransky, 1988). Además, fue detectado con mayor frecuencia y cantidad en lesiones periodontales activas que en las inactivas (Dzink, 1988).

Inicialmente se pensó que era una especie subgingival poco común, sin embargo, sus niveles en cantidad están fuertemente relacionados con un incremento en la profundidad de bolsa (Grossi, 1995)

Se ha detectado con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad periodontal refractaria (Listgarten, 1993) y se ha considerado como el factor de riesgo microbiano más significativo para el progreso de la enfermedad periodontal que distingue a los sujetos con periodontitis, de los sanos; ya que se encuentra en un 79% y un 38% respectivamente (Grossi, 1995).

Experimentos con doble marcaje demostraron que esta especie bacteriana estaba tanto dentro, como sobre las células epiteliales de las bolsas periodontales, lo que es un indicio de la capacidad invasora de este microorganismo. (Listgarden, 1993).

Además, posee gran significancia en la pérdida de inserción. Matcher y Tanner encontraron que aún en enfermedad periodontal leve, los sujetos que poseían esta bacteria presentaban 3.7% mayor riesgo de pérdida de inserción y altura de la cresta alveolar ósea, que pacientes sin esta especie bacteriana (Tanner, Zambon, 1998).

Produce una enzima tipo tripsina como *Porphyromonas gingivalis* que es su factor de virulencia más importante.



Imagen al microscopio de *Tannerella forsythia*

### ***Streptococcus intermedius***

Dentro del género *Streptococcus* se han identificado más de treinta especies.

Taxonómicamente se clasifican según el tipo de hemólisis que producen (alfa, beta y gamma) y según el antígeno de pared celular (serogrupos que se designan de la A a la H y de la K a la V).

Debido a la heterogenicidad de sus características, *Streptococcus intermedius* ha recibido diferentes nombres en la literatura.

Proviene de la familia *Streptococcus viridans* que fue descrita por Guthof en 1956, posteriormente Colman y Williams en 1970, clasifico al grupo *Streptococcus viridans* en: *Streptococcus milleri* en honor al microbiólogo W. Miller que incluye a *S. intermedius*, *Streptococcus constellatus*, y *S. anginosus*.

Es una bacteria que es parte de la flora normal en la cavidad oral, placa subgingival, así como del tracto respiratorio superior: nasofarínge, orofarínge, y urogenital femenina, además ocasionalmente en tractos gastrointestinales (Dzink, 1983)

Microbiológicamente es un coco pequeño, gram positivo, catalasa negativo, no formador de esporas, inmóvil y anaerobio aereotolerante; lo cual lo hace facultativo, con patrones hemolíticos variables que forma colonias pequeñas de menos de 0.5 mm y se considera un patógeno oportunista. Es sacarolítico, lo que significa que descompone el metabolismo de los azúcares para producir energía.

Dentro de las características especiales de este microorganismo es que produce ácido a partir de la glucosa, lactosa y manitol entre otros azúcares, además de formar biopelículas para protegerse del sistema inmune y de los antibióticos y produce enzimas hidrolíticas que destruyen los tejidos.

Se han encontrado diversos reportes que asocian a esta bacteria con infecciones purulentas graves, con tendencia a formar abscesos metastásicos parenquimatosos, afecciones del sistema nervioso central e hígado, infecciones profundas, endocarditis y enfermedades pulmonares. (Socrasny, Haffajee 2000)

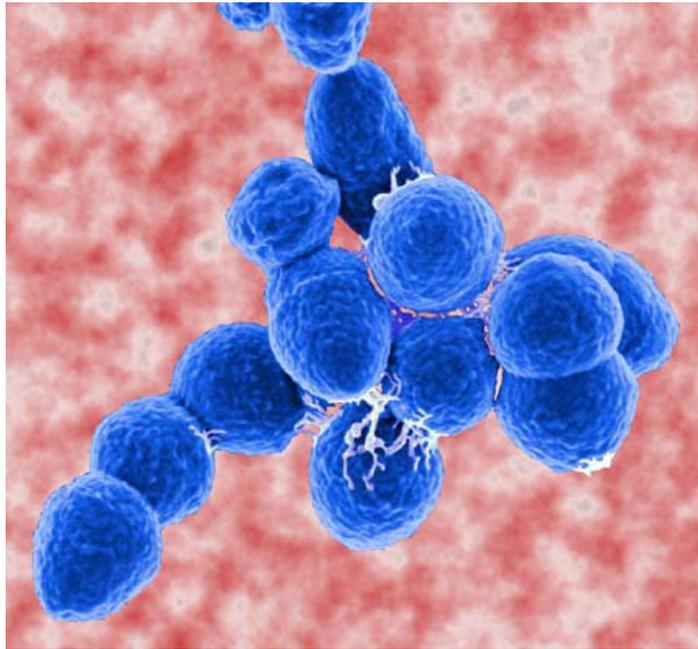


Imagen al microscopio de *Streptococcus intermedius*

#### **4.1.8 Complicaciones sistémicas de la periodontitis**

Además de las complicaciones locales importantes de esta entidad patológica como: sangrado, abscesos, dolor, dificultad al masticar, deterioro funcional, caries radicular, disminución de la calidad de vida y pérdida de las piezas dentales; en los últimos años se han realizado estudios clínicos de tipo transversal en donde se asocia la enfermedad periodontal con un mayor riesgo de padecer enfermedades sistémicas como: enfermedades cardiovasculares, pulmonares, ateroscleróticas, hipertensión e hipercolesterolemia, diabetes mellitus, artritis reumatoide, partos prematuros y de bajo peso al nacer. (Paster, 2006; Mawardi, 2015)

Loesche en 1994, sugirió que las infecciones periodontales inducen una bacteremia de bajo nivel y una exposición del huésped a las endotoxinas de las bacterias que afectan la integridad endotelial, la función plaquetaria y la coagulación sanguínea.

Las enfermedades cardiovasculares representan una causa de muerte a nivel mundial importante, más del 30%; la aterosclerosis es el responsable del 50% de la mortalidad mundial.

DeStefano, en 1993 reportó que sujetos con enfermedad periodontal poseen un 25% de riesgo de padecer enfermedad coronaria cardíaca comparado con individuos con salud periodontal.

Beck en 1996 determinó que la enfermedad periodontal severa esta asociada en un 25% a 90% con un aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Geerts en el 2004 enfatizó que el 91% de los pacientes con enfermedades cardiovasculares presentaban periodontitis de moderada a severa.

Pussinen en el 2003 reportó en el primer estudio de su tipo, la asociación de enfermedad coronaria cardíaca como mayor riesgo de padecerla en aquellos individuos con enfermedad periodontal por la identificación en los niveles séricos de anticuerpos contra *P. gingivalis*.

En relación a la aterosclerosis, Cairo en el 2004 detectó en muestras de placas ateromatosas de carótida el DNA de bacterias periodontopatógenas; *T. forsythensis* 79%, *F. nucleatum* 63%, *P. intermedia* 53%, *P.gingivalis* 37% y *A. actinomycetemcomitans* en un 5%. Además de también encontrarse dichas bacterias, en placas ateromatosas tanto aórticas como coronarias.

En cuanto a la asociación con diabetes mellitus; un desorden metabólico caracterizado por hiperglicemia que es provocado por la deficiencia de secreción o actividad de la insulina. El número de adultos diagnosticados con diabetes tipo II a nivel mundial se estima en 250 millones al día de hoy.

Periodontopatógenos, especialmente *P. gingivalis* tiene la habilidad de invadir el endotelio vascular profundo y puede agravar las complicaciones microvasculares y están relacionados con dificultad para controlar la enfermedad sistémica por lo que al tratar oralmente la enfermedad periodontal, será más fácil tener niveles más controlados de glucosa .

También se han reportado datos que sugieren relación entre periodontitis crónica y partos prematuros con bajo peso al nacer, se determina como bajo peso aquellos con menos de 2500 grs., prematuros cuando poseen menos de 37 semanas de gestación.

En estos análisis se detectó que el 18% de ellos están asociados con infecciones periodontales; así mismo también se asocia con endocarditis bacterial en niños; así como osteomielitis y osteoporosis. (Offenbacher, 1996)

Aunque la causa precisa de bajo peso en un 25% a 50% es desconocida, se sugiere como una conexión posible entre la enfermedad periodontal por la infección de anaerobios gram negativos que generan un aumento de las prostaglandinas proinflamatorias y citosinas que pudieran causar ruptura de la membrana amniótica.

Madianos en el 2001, examinó el potencial de organismos del complejo rojo, relacionados a enfermedad periodontal severa en madres embarazadas, de las cuales 66.7% tuvieron partos prematuros.

Mercado en el 2001, estudio la asociación entre periodontitis y artritis reumatoide encontrando que existe 68% más pérdida ósea en individuos con artritis reumatoide que en aquellos sin esta enfermedad autoinmune que es del 30%; así mismo reportó Dissick en el 2010 que los individuos con artritis son más propensos a padecer enfermedad periodontal de moderada a severa, además de mayor pérdida de piezas dentales en un 50%.

Moen en el 2006 detectó en el líquido sinovial un 87.5% de bacterias orales de pacientes con artritis siendo las más prevalentes *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* y *T. Denticola*.

Martínez en el 2009, determinó los porcentajes de dichas bacterias orales en el líquido sinovial *P. intermedia* (89%), *P. gingivalis* (57.8%), *T. dentícola* (31.5%) y *T. forsythensis* (10%).

Kobayashi en el 2007, detecto que los pacientes con artritis reumatoide, el 68% de ellos padecían enfermedad periodontal. Este estudio es similar al propuesto por Pischon un año más tarde en donde concluye que individuos con artritis tienen 6 veces más posibilidad de padecer enfermedad periodontal que aquellos que no presentan esta condición autoinmune.

Al-Katma en el 2007, define la importancia del control oral de la enfermedad periodontal para el mejoramiento de la artritis, ya que analizó sujetos con artritis

reumatoide que recibieron tratamiento periodontal y mejoraron 58.8% su condición autoinmune, contra aquellos sin tratamiento, que sólo mejoraron un 16.7%.

La enfermedad periodontal y osteoporosis comparten la similitud de la pérdida ósea. La osteopenia, es la reducción de la masa ósea debido a un desbalance entre la resorción ósea y la formación ósea; resultando en una desmineralización y consecuente osteoporosis.

Nagasawa en el 2002, ha encontrado que microorganismos del complejo rojo crean endotoxinas que afectan la osteoprotegerina y activan rank L involucrados en la formación y maduración de los osteoclastos; por lo que inducen a la pérdida de masa ósea. Así mismo, la periodontitis activa la respuesta proinflamatoria reclutando citocinas y prostanoïdes llevando a la activación de los osteoclastos e induciendo resorción ósea.

Tezal en el 2000 encontró además, una correlación positiva estadísticamente significativa entre la enfermedad periodontal y deficiencia de estrógeno; ambos son factores de riesgo que pudieran ser suficientes para inducir osteoporosis.

#### 4.1.10 Control microbiológico de la placa

El método idóneo para la eliminación de la placa es mediante el raspado y alisado radicular; además de una buena higiene oral en casa; pero también, existen agentes antimicrobianos que actúan como coadyuvantes para eliminar el biofilm de la placa bacteriana de manera secundaria, dando por resultado el restablecimiento de la salud periodontal.

Paul Erlich, inició la terapia antimicrobiana, expresando que debían existir sustancias que administradas al organismo humano actuaran sobre el microorganismo, sin afectar los procesos normales del cuerpo.

Un antimicrobiano de acuerdo a su actividad puede ser:

- Bacteriostático: cuando inhibe el desarrollo microbiano mediante el bloqueo de diferentes factores de reproducción. A consecuencia de ello, se produce una multiplicación más lenta de los gérmenes.
- Bactericida: cuando destruye las bacterias en mayor o menor proporción. Se explora mediante el recuento de los gérmenes supervivientes después de su contacto con el antimicrobiano.(Flemming, 2011)

- **Clorhexidina**

El digluconato de clorhexidina es el antiséptico más efectivo del grupo de las bisguanidas, que ha sido utilizada extensamente como desinfectante cutáneo y agente antiplaca, posee un amplio espectro contra hongos y bacterias Gram - y Gram +, dando una reducción de la flora bacteriana del 80 al 90% y su efecto se mantiene prolongado por varias horas, debido a que se fija a la mucosa oral y al esmalte por su fuerte carga positiva y se libera lentamente en la cavidad oral por 8 a 12 horas más. Esto se refiere a la sustentividad, lo cual es el factor que le da la superioridad a este agente frente a los demás. (Zanatta, 2007)

Su efecto antimicrobiano, se da porque al ser atraídos los microorganismos a la molécula de clorhexidina, ésta aporta cargas electropositivas que modifican el funcionamiento normal de la membrana citoplasmática, provocando la lisis celular y eliminando así las bacterias.

Su uso oral se emplea a concentraciones de 0.12% y 0.2% por disposición de la Federal Drug Administration (FDA) en forma de colutorio y gel. Sin embargo, a pesar de las enormes ventajas que presenta este antiséptico, su función es más antiplaca que antimicrobiano. Además, estudios a largo plazo parecen demostrar que se producen resistencias de las bacterias frente a la clorhexidina, lo cual, unido a sus efectos adversos como tinción color marrón en dientes, restauraciones y dorso de la lengua, alteración del sentido del gusto, favorece la acumulación de tártaro supragingivalmente, sensación de ardor y

descamación de la mucosa oral así como sequedad bucal; impiden que esta sustancia sea recomendable para todo el mundo durante períodos indefinidos; además de ser de alto costo. (Giannelli, 2008)

## **4.2 Fitoterapia**

### **4.2.1 Antecedentes**

Las plantas medicinales siempre han estado ligadas con el bienestar de la humanidad. La primera información detallada sobre sus usos data de China tres mil años antes de Cristo. En el año 77 a.C. Pedazio Dioscórides, médico del ejército de Nerón, escribió “De materia médica” en la que menciona a fondo 600 plantas medicinales conocidas y utilizadas por los griegos, y que fue considerada durante quince siglos, la obra cumbre de la botánica y la farmacia. (Bruneton, 2001)

En los últimos años, ha ido formándose una nueva tendencia desde los países ricos que propicia otra cultura de la salud, dentro de la cual, los productos naturales y en general el naturismo, es una actitud existencial que va siendo de mayor importancia.

Es desde aquí, que las plantas medicinales “regresan” a ocupar interés en la población y consorcios farmacéuticos mundiales; ya que el desarrollo tecnológico de la química, la farmacología y la biotecnología permite hoy

construir un paradigma médico completamente distinto al que existía unos decenios atrás.

Hoy se sabe que las propiedades medicinales y curativas de las plantas son gracias a ciertas sustancias de diversa composición química, conocidas como metabolitos secundarios, cuya actividad, resulta tóxica para los microorganismos. Su marcada acción fisiológica sobre el organismo humano, les confiere su valor medicinal, siendo indiscutibles las ventajas de estas sustancias debido a una asimilación más natural por el hombre, a diferencia de los medicamentos sintéticos que por definición le son extraños. (Sánchez, 2000)

Los nuevos productos de plantas medicinales, son llamados “fitofármacos”, y se estima que producirán una revolución terapéutica en los próximos años. Estos, son un nuevo tipo de producto: apoyadas en la tradición médica popular, las plantas arriban con un legado ancestral de uso empírico eficaz y seguro para que la nueva ciencia los valore, desarrolle y comercialice (Lininger, Brown, 1999)

Actualmente, la OMS estima que el 80% de la población mundial utiliza las plantas medicinales para prevenir, curar o atenuar alguna enfermedad; este hecho pone al descubierto el creciente interés por la fitoterapia como un tratamiento para las enfermedades.

Se estima en 5,000 el número de especies estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica, pequeña fracción del total estimado en 300,000 especies. (Bruneton, 2001)

México, ocupa el tercer lugar en el mundo en biodiversidad, por lo que posee una gran variedad y larga tradición del uso de plantas medicinales; sin embargo, existen gran cantidad de ellas que tienen actividad biológica importante y no han sido estudiadas aún. De las 7,000 especies vegetales botánicamente clasificadas en México, se estima que 3,000 son empleadas con fines medicinales y su utilidad se remonta a la época prehispánica. (Fernández, 2007, González, 1998)

Sin embargo, la literatura existente contiene amplia información del uso tradicional de las especies vegetales, pero muy poca o nula evidencia científica que valide su uso. Tan sólo aproximadamente 600 especies mexicanas se han examinado en su composición química; pero sus actividades biológicas han sido poco estudiadas; extractos de cerca de unas 180 especies poseen actividad antimicrobiana *in vitro* gracias a sus compuestos activos. (Lozoya, 2000).

### **4.2.1 Concepto**

La OMS ha definido como fitoterapia o fitomedicina a la ciencia que estudia la aplicación de productos de origen vegetal con finalidad terapéutica ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico.

El uso de plantas medicinales ha acompañado al hombre desde su aparición en la Tierra. Los primeros homínidos encontraron en la naturaleza un proveedor de remedios para sus enfermedades y dolencias.

Nuestro país, cuenta con una antiquísima tradición en el uso de la herbolaria medicinal, los toltecas conocían las cualidades y virtudes de las hierbas y fueron los primeros inventores de la medicina y aún los primeros médicos herbolarios. (González, 1998)

El códice de Juan Badiano, escrito originalmente en náhuatl por Martín de la Cruz en 1552 y traducido en latín años después por Juan Badiano y el códice de Mendoza, fueron realizados en un período posterior a la conquista y reflejan cómo los aztecas plasmaron y sintetizaron en sencillos rasgos los caracteres más significativos de la morfología de cada una de las plantas utilizadas, así como las propiedades y terapéutica conocida y experimentada por los médicos en aquél entonces llamados "ticitl".

### 4.3 Planta de estudio: *Fluorensia cernua* (Hojasén)

Su taxonomía comprende:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Fluorensia*

El género fue descrito en 1836 por Asa Gray; naturalista, médico y considerado el botánico más importante del siglo XIX.

Las hojas de esta planta poseen importantes propiedades desinfectantes y efectos antimicrobianos, también se utiliza para la indigestión, dolores estomacales, diarreas y expectorante, gracias a sus aceites esenciales y terpenos. (Arredondo, 1981).

#### - Compuestos Activos

La fragancia de la planta es llamada quinta esencia o fracción de aceite esencial, que corresponde a metabolitos secundarios denominados terpenos, cuya estructura química general es  $C_{10}H_{16}$ . Se ha identificado a través de cromatografía de placa de sílica con compuestos químicos volátiles por extracción sucesiva de hexanos, diéter y etanol, que *Fluorensia cernua* principalmente tiene terpenos en la forma de monoterpenos y sesquiterpenos

los cuales poseen actividad contra bacterias gram positivas y negativas, hongos, virus y protozoarios.

Mata en el 2003 aisló tres compuestos activos de *F. cernua* importantes para su actividad antimicrobiana y antifúngica, los cuales son ácido dehidrofluorescente, fluorensadid y metil-orselinato.

Wong-Paz en 2015 analizó el contenido total fenólico de varias plantas incluyendo *F.cernua*, *Jatropha dioca* (Sangre de drago), Eucalipto y Damiana; concluyendo que, *F.cernua* posee un potencial importante en compuestos fenólicos bioactivos con altas propiedades antioxidantes para el tratamiento de enfermedades.

- Actividad antimicrobiana y antimicótica

Se ha probado *Flourensia cernua in vitro* como planta fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Phytium sp*; así mismo ha mostrado actividad antibacterial contra gram positivos y negativos. (Tellez et al, 2001; Castillo, 2010)

Molina-Salinas et al (2006) evaluó la efectividad contra cadenas de *Mycobacterium tuberculosis* mostrando resultados favorables en concentraciones minimas inhibitorias de 50 ug/ml en dilución de hexano y de 100 ug/ml en solvente de acetona.

También se ha evaluado contra *Pseudomonas* mostrando resultados favorables y gran efectividad.

Salazar et al (2008) llevo a cabo un estudio para evaluar el empleo de *Fluorensia cernua* en otros campos y se ha reportado en estudios preliminares que es efectivo contra cinco líneas celulares de cáncer de mama.

#### **4.4 Investigaciones existentes relacionadas**

En 1991 Osawa, K. examinó los efectos inhibitorios de actividades enzimáticas en los extractos de *Ginkgo biloa*, *Salvia officinalis* y *Camellia sinensis* contra la acción colagenolítica de *P. gingivalis*. Los resultados arrojados fueron mejores de lo esperado, ya que todos mostraron fuertes efectos inhibitorios en la actividad colagenolítica y fueron mayores que los de la tetraciclina; además de inhibir la citotoxicidad de la enzima de *P. gingivalis* contra los fibroblastos gingivales y con esto su patogenicidad. *C. Sinensis* fue el agente más efectivo.

En 1992, Homer, K.A. probó cinco extractos de plantas usados ampliamente en Kenya por su habilidad para inhibir ciertas enzimas; se probaron contra las bacterias periodontopatógenas: *P. gingivalis*, *B. intermedius* y *Treponema denticola* mostrando una inhibición notable de proteasas y enzima tripsina en *P. gingivalis*, así como de actividades dipetidases de *B. intermedius*, mostrando con ello que el empleo de estas plantas reduce notablemente los factores de virulencia de estas bacterias, además de la formación de flora patógena.

En 1996 Veitia y Vázquez utilizaron la caléndula en extracto fluído al 15% como antimicrobiano en forma de colutorio en pacientes con gingivitis crónica edematosa, encontrándose que en el grupo estudio un 92% pasó a buena higiene, y un 72% obtuvo salud periodontal; en cambio el grupo control sin el uso de este agente, sólo un 40% elevó su higiene; esto refleja que debido a sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y cicatrizantes, la caléndula es una buena opción para la prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales.

En 1997, Li X.C. utilizó el extracto metanólico de *Ceanothus americanus* para probar el efecto antimicrobiano de esta planta contra bacterias orales resultando un efecto inhibitorio de crecimiento contra *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*.<sup>81</sup>

En el año 2000, Koo,H. evaluó la actividad antimicrobiana del *própolis* y *Árnica montana* contra patógenos orales ya que poseen actividades biológicas reportadas con anterioridad como: antiinflamatorias, antivirales, antifúngicos y regeneradores de tejidos. Las especies bacterianas a probar fueron: *Candida albicans*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *A. naeslundii*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *Prevotella denticola*. El extracto de própolis inhibió significativamente todos los microorganismos del estudio; la mayor zona de inhibición fue contra las especies de *actinomyces*; en cambio árnica mostró muy poca actividad casi nula.

En el 2002 Bairy, I. realizó un estudio *in vivo* de la actividad antimicrobiana de las hojas del mango empleando para ello, 50 pacientes. Los estudios microbiológicos revelaron que posee gran efecto antimicrobiano contra *P. intermedia* y *P. gingivalis*, patógenos periodontales específicos.

También en ese año, Groppo, F.C., evaluó *in vivo* la actividad del ajo al 2.5%, el té de árbol al 2% y la clohexidina al 0.12% contra *S. mutans* mostrando tener buena actividad antimicrobiana contra este microorganismo y otras bacterias orales, aunque se reportó mal sabor, náusea y sensación de quemadura al probar el colutorio.

En el 2003 Iauk, L. Probó la actividad antimicrobiana de la caléndula y otras plantas contra *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veinolella parvula*, *Eikenella corrodons* y *Actinomyces odontolyticus* mostrando una menor actividad antimicrobiana que otros extractos.

En el 2004, Takarada, K. probó la eficacia de aceites esenciales como eucalipto, té verde, romero, lavanda y manuka contra bacterias orales mostrando un efecto antimicrobiano contra *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. sobrinus* y *S. mutans* quien tuvo mayor efecto bactericida fue manuka y bacteriostática sólo la lavanda.

También en esas fechas Almas, K. estudió las propiedades del miswak (*Salvadora persica*) cuyas raíces han sido utilizadas ampliamente por miles de años en Asia, África y Medio Oriente como cepillos de dientes, el estudio comparativo *in vivo* se realizó en un grupo control de 40 personas, 20 utilizaban cepillo de dientes y el resto el miswak, para observar los efectos sobre *S. mutans* y *Lactobacillus*. Los resultados obtenidos mostraron una significativa reducción en *S. mutans* en el grupo del miswak y una diferencia no significativa contra el *Lactobacillus*; por lo que *S. Mutans* es más susceptible a la actividad antimicrobiana de la planta que el *Lactobacillus*.

En 2011, Termentzi evaluó la efectividad del *própolis*, el cual contiene todas las resinas que las abejas colectan de diversas plantas y lo mezclan con cera y exudado de sus glándulas salivales. Este compuesto es abundante en flavonoides, pinocembrin y galangin y poseen gran efecto antimicrobiano contra *Streptococcus pyogenes* y *mutans* sugierendo este compuesto para la prevención de caries.

El Aloe Vera se ha estudiado y aplicado para afecciones de la mucosa bucal tales como aftas, procesos inflamatorios, candidiasis, gingivitis y periodontitis. Se ha encontrado, que disminuye el tiempo de curación de lesiones y mejora el flujo sanguíneo; aumenta el correcto entrelazado de las fibras de colágeno sobre la zona lesionada debido a que promueve la regeneración tisular celular

dada por las glicoproteína; la reepitelización y angiogénesis acelerada por la alantoína que facilita la curación de llagas y úlceras bucales.

En 2012 Savoia reportó que gracias a los compuestos naturales de aceites esenciales se ha podido obtener actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y negativas, hongos, levaduras y virus.

Incluso, contra cepas resistentes a antibióticos del mercado, como *Hypericum* que es eficaz contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*; *Daucus carota*; que es capaz de inhibir a *Helicobacter pylori* y *Maleleuca alternifolia* (tea tree) se ha reportado eficaz contra *Mycoplasma pneumoniae*.

## **4.5 Mutagenicidad**

La genotoxicología, disciplina de la investigación toxicológica estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto a si son capaces de producir efectos mutagénicos, carcinogénicos o tóxicos; así como alteraciones patológicas en los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de dichas alteraciones y los medios para contrarrestarlas; así como los procedimientos para detectar, identificar y cuantificar tales agentes y evaluar su grado de toxicidad. (Repetto, 1997)

Un mutágeo, es considerado cualquier agente que induzca mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas estructurales, numéricas, alteraciones al

DNA, a los mecanismos de reparación o a los eventos de recombinación mitótica. (Hofmann, 1996)

De acuerdo a la evaluación del daño se consideran cuatro niveles:

Nivel 1: Mutación génica

Nivel 2: Mutación cromosómica

Nivel 3: Daño primario al DNA

Nivel 4: Transformaciones celulares

Los ensayos de mutación genética y cromosómica son los más empleados; aunque en los últimos años se ha prestado especial atención a los de daño primario al DNA, ya que permiten comprender los procesos carcinógenos o de transformación tumoral de células.

Algunas de las pruebas reconocidas son:

Mutación génica:

- Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*)
- Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*
- Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART)

Mutaciones cromosómicas:

- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos
- Prueba citogenética *in vivo* en ratones
- Prueba de micronúcleos
- Prueba de dominantes letales en ratones

Evaluación al daño primario al DNA:

- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*

#### **4.5.1 Prueba de Ames**

Esta prueba fue desarrollada en 1973 por Bruce Ames, siendo el primer ensayo biológico de corta duración que determina el potencial de mutagenicidad de compuestos químicos y biológicos.

Gracias a este ensayo, en 1975 se demostró que el 60%- 90% de las sustancias o compuestos carcinogénicas eran a su vez mutágenicas. (Ames B, 1975)

Emplea cepa de *Salmonella typhimurium*, construida a través de la ingeniería genética con una mutación en el operón que codifica la biosíntesis de histidina, para detectar compuestos que causen mutaciones genéticas por dislocamiento del cuadro de lectura o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se realiza el ensayo de fracción microsomal de hígado de rata, que consiste en un sistema de

activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema (Sandoval, 1998)

Diferentes cepas de *S. Typhimurium* autotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina. Debido a la composición del medio de cultivo, se forman colonias bacterianas con las células protróficas a histidina procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Después de 66 horas de incubación a 37°C, las colonias revertantes son contabilizadas. El valor igual o mayor a dos, de la expresión obtenida de dividir el número de revertantes en las placas de prueba entre el número de revertantes de la placa control, indica la presencia de actividad mutagénica en la muestra a evaluar.

Las bacterias se extienden sobre una placa de agar con una pequeña cantidad de histidina y el compuesto químico cuyo efecto mutagénico se quiere comprobar. Esta pequeña cantidad de histidina en el medio de cultivo permite a las bacterias crecer por un tiempo inicial y tener la oportunidad de mutar. Cuando la histidina se agota, sólo las bacterias que hayan mutado para obtener la capacidad de producir su propia histidina van a sobrevivir y multiplicarse. En el experimento la placa se incuba durante 48 horas, y la mutagenicidad de la sustancia será proporcional al número de colonias observadas en la placa.

Como consecuencia de la mutación la cepa requiere suministro externo de histidina para que pueda crecer. Con esto, se pone a prueba la capacidad

del mutágeno para provocar una alteración genética en las bacterias que permita el retorno de crecimiento en un cultivo libre de histidina.

## **4.6 Citotoxicidad**

La citotoxicidad celular es la alteración de funciones celulares básicas que conlleva a un daño el cual puede ser detectado. En la actualidad, se han desarrollado determinadas pruebas *in vitro* que son útiles para predecir los efectos tóxicos de drogas y sustancias químicas, utilizando como modelos experimentales cultivos celulares primarios, órganos aislados, así como líneas celulares establecidas. (Cordero, 2012)

Según Fresney (2000), los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y en ensayos de supervivencia celular. Los ensayos de supervivencia, se emplean para determinar la proporción de células que e inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas. Con estos ensayos se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>)

Los ensayos de viabilidad, se basan en valorar la capacidad que tienen las células para excluir sustancias a las que son impermeables, ofrecen una interpretación instantánea. Estas pruebas, permiten medir la tasa de supervivencia directamente, a considerar las células que al ser expuestas a un colorante no se tiñen. Son de particular importancia para agentes tóxicos que ejercen sus efectos primarios sobre la integridad de la membrana.

Algunos de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran: el ensayo de captación de rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el de reducción de Bromnuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5.difeniltetrazólico (MTT).

- El ensayo de enlazamiento al azul de kenacid: mediante esta prueba es medido el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular. Si el compuesto es citotóxico a la célula, debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular; como la síntesis del ADN, el adecuado funcionamiento de mitocondrias, síntesis de proteínas o afectación a la integridad de la membrana celular. Al encontrarse afectado el crecimiento celular, debe reducirse el número de células presentes en el cultivo. Por lo general son expuestas al producto por 72 horas y se retira y se coloca el colorante que enlaza las proteínas celulares. Se determina la cantidad de azul retenido por las células y se cuantifica el porcentaje de inhibición de crecimiento celular.

- El ensayo de reducción del MTT: este método es simple y se emplea para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo, lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es

cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que produce un cambio de amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como viabilidad celular. (Eisenbrand, 2002)

#### **4.6.1 Ensayo de Rojo Neutro**

Esta prueba, es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo plazo, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de viabilidad celular.

Se considera compuesto citotóxico, independientemente de su mecanismo de acción, si interfiere en el proceso de división y multiplicación celular. Ello conlleva, a una reducción de la velocidad de crecimiento celular reflejándose en el número de células presentes en el cultivo.

El rojo neutro es captado por los lisosomas y endosomas de las células y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa, se libera el colorante; pues sólo las células viables son capaces de retener el color rojo en su interior. Seguidamente, se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y calculada la concentración que produce la inhibición del 50% del crecimiento celular.

Las células deben ser conservadas en esterilidad en nitrógeno líquido a -190 °C, al usarlas deben ser sembradas en frascos y recuperadas de la exposición de la tripsina. (Arensibia, 2009)

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material Vegetal

El material vegetal investigado en este estudio fue el siguiente:

<u>Nombre común</u>	<u>Nombre científico</u>	<u>Parte empleada</u>
Hojasén	<i>Flourensia cernua</i>	Hoja

#### 5.1.1 Obtención del material vegetal

Con la ayuda del Biólogo Mauricio González se acudió al municipio de Marín, N.L. a nivel del pozo acuífero #10 para recolectar el Hojasén. Esta colecta fue realizada en fechas que inicia la floración y es cuando las especies vegetales tienen ya sus principios activos y son plantas jóvenes.

Las plantas fueron identificadas por el Biólogo y se separó un ejemplar como muestra para el herbario del departamento de Botánica de la facultad de Ciencias Biológicas con número de registro 024181.

#### 5.1.2 Preparación del material vegetal

Se deja secar a la sombra las hojas que son las que se emplearán por un lapso de 30 días; posteriormente son trituradas en molino manual Victoria®; el polvo obtenido se coloca en la balanza granataria con papel encerado; se pesa

el papel primero que fue de 2.2 grs y sobre él se coloca el polvo de *Fluorensia cernua* que fue de 48.25 grs dando un peso neto de 46.1 grs.

### **5.13 Realización del extracto**

Para este proceso se requiere la extracción de los principios activos por medio de solventes de polaridad creciente, mediante la técnica de maceración a temperatura ambiente con agitación constante; para ello se toman los 46 grs. del *Fluorensia cernua* y se depositan en un matraz Erlen Meyer agregándole 150 ml. de metanol al 99.95% con una probeta, se le coloca un tapón envuelto en papel aluminio y posteriormente sujetado con cinta adhesiva para que selle en el matraz y evitar que se desaloje con la vibración constante.

Se coloca en el agitador Dual Action Shaker Lab Line<sup>®</sup> dejándolo por un período de 7 días. Transcurrido ese tiempo, se ejecuta la primera extracción, filtrando el contenido mediante papel filtro Whatman No.1 y se deposita en un vaso de precipitado, el cual es tapado con papel aluminio con pequeñas perforaciones para que se evapore el solvente del extracto colocándolos en la campana de extracción.

Al residuo de la planta sobrante en el matraz, se le depositan nuevamente 150 ml. de metanol y es colocado en el agitador por 7 días más. Pasado ese tiempo se realiza la segunda extracción y se pasa ahora sí por el rota vapor para extraer el solvente empleado y dejar puro el extracto vegetal.

Una vez evaporado el contenido del vaso de precipitado, se procede a raspar con una espátula el extracto adherido a las paredes y piso del vaso. El peso total de extracto sedimentado fue de 8.62 grs pesado en balanza granataria distribuidos en 2 viales color ámbar para no afectar sus propiedades con la luz. El rendimiento total del extracto fue de 18.74% puesto que se colocaron 46 grs iniciales y se obtuvieron 8.62 grs finales.

Para sacar la concentración del extracto se tomó en cuenta el control negativo el cual es la clorhexidina que se encuentra a una concentración de 0.12% por lo que se tomaron 0.25 gr. / ml. del extracto y se le agregaron 1.2 ml. de etanol y 1.8 ml. de agua bi-destilada estéril.

## **5.2 Material biológico**

### **5.2.1 Obtención del material microbiológico**

Las cepas de las bacterias *Porphyromonas gingivalis* (ATTC 33277), *Streptococco intermedius* (ATTC 27335) y *Tanerella forsythensis* (ATTC 43037), fueron proporcionadas por la Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos, las cuales se encontraban conservadas en glicerol al 20% en un refrigerador a -70°C en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UANL.

### **5.2.2 Activación de las cepas**

Para la activación es necesario tener el medio estéril a través de un mechero y realizándose dentro de la campana de flujo LabConco® Purifier Class II Biosafety Cabinet que utiliza luz UV para esterilizar.

Se tomó una licuota de cada bacteria con una micropipeta Eppendorf y se inoculó dentro de los tubos BBL con Infusión Cerebro Corazón (BHI), los cuales fueron colocados en la incubadora Shell Lab® a 37 °C durante 7 días.

Posteriormente se tomaron 500 µl. de cada tubo con el crecimiento bacteriano y se depositaron en cajas de agar sangre de carnero para inocularlas mediante el asa de vidrio previamente pasada por la flama para esterilizarla. Ya sembradas, las cajas fueron depositadas dentro de una bolsa anaeróbica de GasPak- BBL® la cual viene provista de un reactivo generador de CO<sub>2</sub>, un catalizador de paladio y una tira indicadora de anaerobiosis. A la bolsa se le agrega 1 ml. de agua bidestilada estéril en el compartimiento especial para iniciar la atmósfera anaeróbica y se sella bien con cinta testigo para depositarla en la incubadora a 37°C por 7 días.

Se colocó una colonia de cada caja de petri dentro de un tubo con infusión cerebro corazón y se pasa por el vórtex maxi-Mix Thermolyne tipo 16700 para homogenizar la mezcla. Estos tubos son depositados en la incubadora a 37°C por 7 días más.

Posterior a esto, se tomaron 0,5 µl. de cada tubo y se colocó en una caja de agar sangre de carnero y se realizó la siembra por medio de estrías mediante el asa bacteriológica; también llamada la técnica de las tres zonas o dilución.

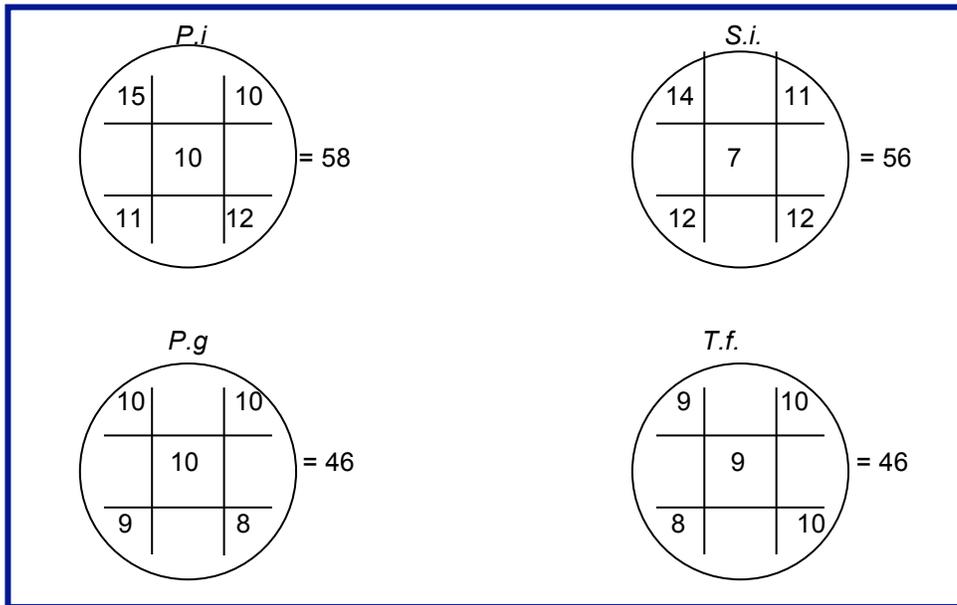
Estas cajas se introducen en una bolsa GasPak<sup>®</sup> y se colocan en la incubadora por 7 días. Al cabo de este tiempo ya se obtienen las colonias asiladas de cada una de las bacterias a probar en el estudio.

### **5.2.3 Cultivo de bacterias**

Se toma una colonia de cada caja correspondiente a cada bacteria y se resuspende en 100 µl de agua bidestilada estéril y se homogeniza la mezcla pasándola por el vórtex.

Posteriormente se realiza el conteo de las colonias por medio del microscopio colocando 10 µl de cada uno de los tubos en la cámara de Thoma, provista de numerosos cuadros; se toman en cuenta los mayores de las 4 esquinas y el central; en cada uno de ellos se contabiliza el número de bacterias vivas que son observadas al microscopio y se realiza la suma total. Esto se realiza para estandarizar la cantidad de muestra bacteriana que se aplicara a cada caja de petri.

**Conteo total de bacterias vivas para el estudio de cada cepa.**



### 5.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Esta ya había sido evaluada en el 2004 en la anterior investigación mediante el método de difusión de placa; Pero se volvió a correr el estudio.

Se toman 100  $\mu$ l. del sobrenadante bacteriano y se colocan en el centro de la caja de petri con agar sangre de carnero y se siembran por la técnica de plateo o estría cerrada mediante un asa de vidrio con la que se esparce el inóculo.

Las cajas se dividen en cuatro zonas y en tres de ellas se coloca un papel filtro estéril Whatman #1 Ps, humedecido con 10  $\mu$ l del extracto a probar a diferentes concentraciones 100, 200 y 300 $\mu$ g y en la zona restante se coloca

un papel filtro con el control negativo; el cual, es etanol con agua para descartar la acción bactericida del alcohol contra las bacterias. Para cada cultivo bacteriano se realizan tres repeticiones similares.

Por último se siembran 3 cajas de petri más, una por cada bacteria, para colocar en ellas, el control negativo a comparar al centro; que es la clorhexidina.

Las cajas de petri ya sembradas son depositadas en la cámara de anaerobiosis Analytical Balance Chamber Glove Box® previamente preparada (Véase anexo II) y se dejan ahí por espacio de 7 días.

Transcurrido ese tiempo, se procede a la medición de halos de inhibición de crecimiento bacteriano por medio de un vernier para contabilizar el diámetro en milímetros sin crecimiento bacteriano alrededor de los papeles filtro impregnados con la solución a testigo a probar.

### **5.2.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

La concentración mínima inhibitoria es considerada el estudio “gold estándar” para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos. (Andrews 2001).

Se define, como la concentración más baja a la cual un agente antimicrobiano inhibe el crecimiento visible de un microorganismo luego de su incubación.

Incluso para los nuevos agentes antimicrobianos, la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) es uno de los pasos esenciales para evaluar eficazmente el potencial antimicrobiano; así mismo, a través de esta prueba obtenemos el grado de resistencia de las bacterias a probar ante dichos agentes antibacteriales. (Hendrisken 2003).

Preparación y concentración de la solución del extracto de *Fluorensia cernua*

Para evaluar el efecto antimicrobiano en el estudio de macrodilución, por el método de difusión de placa; una vez obtenido el extracto puro, se seleccionan tres rangos apropiados de concentración, en este caso fueron 300 mg/ml, 200 mg/ml y 100 mg/ml

Para su elaboración se empleo la siguiente fórmula:

$$C_1V_1= C_2V_2$$

C= Concentración    V= volumen

En donde  $C_1$  y  $V_1$  es con lo que cuento y  $C_2$  y  $V_2$  es lo que deseo preparar.

En el vial stock se coloca el vehículo necesario para preparar los tres viales a concentración decreciente, compuesto por 1.8 ml de metanol al 99.9% con 1.2 ml de Agua bidestilada estéril dando un total de 3 ml del vehículo a disolver en el extracto en cada diferente concentración.

En el vial 1 se colocaron 1 ml de la solución stock con 300 mg del extracto puro. En el Vial 2 se coloca 660  $\mu$ l del Vial 1 además de 340  $\mu$ l del Vial Stock. En el vial 3 se colocan 330  $\mu$ l del Vial 2 junto con 670  $\mu$ l del vial stock.

### Preparación del inóculo

El inóculo de las bacterias a probar debe ser ajustado y estandarizado a la Escala nefelométrica de McFarland 0.5, esto es de suma importancia para poder obtener resultados precisos y reproducibles.

Se recomienda el tamaño final de inóculo de  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{ml}^{-1}$ . Un inóculo con mayor porcentaje de UFC daría un incremento en el MIC, así mismo un inóculo con menor porcentaje de UFC daría un MIC menor, con falsos resultados.

La preparación de la escala de McFarland se realiza de la siguiente forma y tiene una vida útil de 6 meses, posterior a este tiempo, se recomienda hacer una nueva.

<b>Componentes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Cloruro de Bario al 1% (BaCl<sub>2</sub>)</b>	0.1 ml	0.2 ml	0.3 ml	0.4 ml	0.5 ml	0.6 ml	0.7 ml
<b>Acido Sulfurico puro al 1% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	9.9 ml	9.8 ml	9.7 ml	9.6 ml	9.5 ml	9.4 ml	9.3 ml
<b>Densidad celular aproximada (<math>\times 10^6</math> ml)</b>	3	6	9	12	15	18	21

Se toman de 4 a 5 colonias bien formadas e identificadas de cada bacteria a probar previamente cultivadas en agra sangre de carnero con no más de 72 horas de crecimiento para que sean colonias jóvenes y con ellas preparar la suspensión bacteriana y evitar un variante atípico. Deben emplearse las suspensiones dentro de los 30 minutos de su preparación.

La densidad de la suspensión celular se debe estandarizar con el tubo 1 de la escala de McFarland al cual se le agregan 10 ml de Agua bidestilada estéril para tener la densidad de 0.5 McFarland que corresponde a 0.05 de absorbancia, si está muy turbio el tubo del inóculo, deberá agregársele más medio de cultivo para que baje la cantidad de bacterias, si por el contrario está muy claro habrá que agregarle mas bacterias. La suspensión deberá contener entre  $10^7$  a  $10^8$  ufc/ml

También debe ser corroborada con el espectrofotómetro leído a 550 nm de longitud de onda, se oprime el botón de letra A (Absorbancia) y luego en la tecla 100% T/OA .

Se debe colocar en espectrofotómetro primero el tubo que es el blanco, es decir, el que contiene el medio de cultivo solo sin bacterias leído a 550 nanómetros y deberá ser cero de absorbancia. A ese tubo si le agrego las bacterias para preparar la suspensión en este estudio se agregaron 200  $\mu$ l de cada bacteria debe dar de resultado 0.05 de absorbancia para que la concentración este ajustada a 300 millones de bacterias por ml.

### Procedimiento

Se toman 100 µl de dicha suspensión bacteriana ajustada a la asorbancia ideal y se vierten en la caja de petri con agar sangre de carnero. Se espátula la caja a través la técnica de estría cerrada.

Dicha caja será dividida en 4 porciones a evaluar con tres repeticiones para cada bacteria.

Se coloca un papel filtro impregnado con 10 µl del extracto en sus diferentes concentraciones 300, 200 y 100 mg/ml así como un papel filtro impregnado con el vehículo solo para determinar que por sí mismo no posea actividad antimicrobiana que haga variar los resultados y este será el control negativo.

En otras tres cajas de petri se evaluara el Control Positivo, que es la clorhexidina impregnado el papel filtro con 10 µl de este agente.

Se colocan las cajas de petri en bolsas de anaerobiosis GasPAck (BBL)<sup>®</sup> en la cámara de anaerobiosis previamente preparada con un ambiente gaseoso de 5% CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub> para generar el crecimiento bacteriano y posteriormente analizar los halos de inhibición bacteriana en cada concentración posterior a 96 horas de incubación a 37° C.

### Método de microdilución

Se emplea una microplaca de 96 pozos con doce columnas enumeradas del 1 al 12 y ocho filas marcadas con letras de la A a la H. El medio de cultivo empleando fue el de Mueller Hinton dentro de la cámara de anaerobiosis.

Este estudio se hizo creando dos tubos por separado con extracto que serán los probados en la microplaca al cuádruple de la actual concentración de la clorhexidina y al triple; dado que no hay estudios previos que determinen la concentración posible a emplear.

El vial 1 para iniciar a una concentración de 480 mg/ml y el Tubo 2 para iniciar con concentración de 360 mg/ml.

Para el vial 1 se agregaron 2000 mg de extracto puro con 600 µl de metanol al 99.9% y 400 µl de agua bidestilada estéril.

Para el vial 2 se agregan 1500 mg de extracto puro con 600 µl de metanol al 99.9% y 400 µl de agua bidestilada estéril.

Esta técnica consiste en depositar 50 µl del extracto de la concentración a probar en la primera fila y de ahí una vez mezclado con el medio con la micropipeta haciendo subir y bajar la mezcla tres veces para homogenizarla, se retiran 50 µl consecutivamente hacia abajo para ir creando la dilución seriada hasta que en la última fila se extraen los últimos 50 µl.

Es decir la dilución se hace a través de la placa dentro de la cámara de anaerobiosis.

1. Se inicia colocando con una micropipeta Ependorff 100 µl de medio de cultivo en los 96 pozos de toda la placa.
2. En los primero cuatro renglones de la columna 1 se colocan 100 µl más de medio, será el control que indique la esterilidad de la prueba o bien la contaminación de ella.

3. En la columna 2 se colocan 100  $\mu$ l del control Positivo que es la clorhexidina.
4. En la columna 3 se agregan 100  $\mu$ l del vehículo empleado para la dilución de los extractos en sus diferentes concentraciones.
5. Las columnas 4, 5 y 6 será donde se evaluara la primera concentración mayor del extracto por triplicado decreciendo la concentración conforme bajan las filas.
6. La columna 7 será de control o testigo colocando solo el extracto sin bacterias.
7. La columna 8 será de control colocando solo medio de cultivo para evaluar que no exista contaminación entre una concentración y la otra.
8. Las columnas 9, 10 y 11 servirán para evaluar la siguiente concentración del extracto por triplicado y decreciendo conforma se llega a la fila H que es la ultima.
9. Finalmente la columna 12 tendrá el extracto de la segunda concentración sin bacterias,
10. Para finalizar se le agregan 100  $\mu$ l de microorganismos en todos los pozitos excepto los de las columnas 7 y 12 que son testigos.

Se sella con parafilm para evitar contaminación y se deja en la cámara de anaerobiosis por 4 días.

Una vez transcurrido este tiempo, se retira de la cámara para proceder a su lectura e interpretación corroborando que no exista contaminación entre las columnas.

Como los materiales vegetales involucran monoterpenos y terpenos hidrocarbonados, crean sedimento que hace difícil la lectura en el espectrofotómetro Ultraspec III LKB<sup>®</sup>, así como la visibilidad a simple vista, cada uno de los pozitos tuvo que ser evaluado individualmente para evitar falsos resultados.

También se puede emplear un indicador que tiñe las células para evaluar la viabilidad celular. Además de que las emulsiones oleosas vegetales interfieren con la lectura.

Chand et al. (1994) empleo el substrato fluoregénico de diacetato de fluorescencia (FDA), el cual es activado a través de una enzima para generar un compuesto fluorescente. Sin embargo, es difícil su empleo.

Carson (1995) utilizó el Cloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC) y el Resazurin al 0.005% indicador de oxido reducción que se emplea para la evaluación de calidad microbiológica de la leche bronca. Actualmente también es utilizado como agente visual para pruebas de MIC ya que tiñe de color rosa fucsia en presencia de oxígeno, para evaluar la esterilidad de productos biológicos y farmacéuticos.

En este estudio se empleó MMT el cual tiñe de azul las células vivas. Los pozos claros indican actividad antimicrobiana del extracto mientras que los

pozos azules significa que existen células viables por lo que el extracto no tuvo función antimicrobiana.

La otra forma en la que evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria fue a través de el empleo de viales de vidrio con diluciones seriadas dispuestas para no homogenizar la mezcla dentro de la microplaca y verter directo el producto al pozo correspondiente de la microplaca ya a la concentración establecida a probar. Con la finalidad de evitar contaminación cruzada o falsos resultados.

Se realiza tomando en cuenta que debe ser al doble de lo que se pretende analizar ya que con los 100  $\mu$ l del medio previamente colocado en cada uno de los 96 pozos se diluye a la mitad así que en el vial 1 se colocaron 1000 mg del extracto puro sin diluyente, para dar la concentración de 500 mg/ml. Ya en el pozo de la microplaca con el conjunto del medio de cultivo. En el vial 2 se colocan 800 mg de extracto con 200  $\mu$ l del vehículo generando la concentración de 400 mg/ml.

En el vial 3 se colocan 600 mg de extracto con 400  $\mu$ l del vehículo empleado para disolverlo y una vez en la placa dará la concentración de 300 mg/ml. En el vial 4 se emplean 400 mg de extracto con 600  $\mu$ l del disolvente para generar la concentración de 200mg/ml.

En el vial 5 se colocan 200 mg de extracto con 800  $\mu$ l del vehículo que dara una concentración de 100 mg/ml.

Un sexto vial contendrá el control negativo que es el vehículo empleado para la disolución del extracto. Finalmente en el vial 7 se tendrá el agente control negativo comparativo que es la clorhexidina a una concentración del 2%.

La placa fue incubada a 37°C durante 72 horas, después de este tiempo, los tubos de ensayo se analizan considerando la absorbancia OD600 mediante el espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus marca Bio-Rad®.

La menor absorbancia entre las concentraciones probadas, después de restar la turbidez misma del extracto por su concentración evaluada, se considera que es la concentración mínima inhibitoria.

Para obtener el porcentaje de mortalidad celular bacteriana se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Control de crecimiento} - \text{Corrección (Prueba - Blanco)}}{\text{Control de crecimiento}} \times 100$$

### 5.2.6 Prueba de AMES de Mutagenicidad

Se utilizó el kit de Muta-chrome test EBPI® para la prueba; que contiene una cepa mutante de *Salmonella typhimurium* TA100 llevando mutación en el operón de la síntesis de histidina; el mutágeno estandar de acción directa azida de sodio y todos los agentes reactivos químicos y que deberán ser almacenados en refrigeración (2° a 8°C), así mismo conservarse en obscuridad ya que son sensibles a la luz. Se siguieron las indicaciones del fabricante.

Empleando la campana de flujo con luz ultravioleta esterilizadora previamente encendida por 10 minutos, se procede a hidratar la cepa de prueba liofilizada de *Salmonella typhimurims TA100* y a generar una pre-incubación. Se abre la botella del caldo nutriente al frasco de las bacterias, se cubre con el tapón de goma y se coloca en la incubadora a 37°C durante la noche (16 a 18 horas).

Al día siguiente, una vez evaluado que hay turbidez, indicando el crecimiento de las bacterias; se prepara la dilución para proceder al ensayo.

Se disolvieron 100 mg del extracto vegetal de *Fluorensia cernua* agregando 0.5 ml de DMSO (dimetiulsulfoxido) y agua bidestilada estéril hasta alcanzar un volúmen de 17.5 ml, quedando a una concentración de 100 µg/ml, la cual fue la considerada como la concentración mínima inhibitoria.

Una vez hecho esto, con el filtro que provee el kit de 0.22 µm se procede a filtrar adecuadamente para poder emplearlo en las placas elisa de 96 pozos.

Se prepara la mezcla reactiva mezclando 21.62 ml del concentrado de sales de Davis-Minglioli, más 4.75 ml de D-Glucosa, 2.38 ml de Púrpura Bromocresol, 1.19 ml de D-Biotina y finalmente 0.06 ml de L-Histidina, dando un volumen final de 30 ml suficiente para evaluar las 10 placas de Elisa empleadas en esta prueba ya que se hizo por triplicado.

Posteriormente se colocan 2.5 ml de dicha mezcla reactiva a los tubos prueba con los 17.5 ml del extracto vegetal para dar un volumen de 20 ml.

El mutágeno estándar contenido en el kit es el  $\text{NaN}_3$  (azida de sodio) a una concentración de  $0.5\mu\text{g/ml}$ . Se depositan  $5\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana del cultivo nocturno a cada tubo exceptuando el tubo que contiene la mezcla reactiva y se mezclan muy bien para homogenizar en el vortex.

Se utilizaron 10 placas de elisa con los siguientes tratamientos:

- Control de esterilidad: en donde se coloca con la pipeta multicanal  $200\mu\text{l}$  del agua y la muestra reactiva pero no la bacteria mutágena.
- El background: que contiene adicional los  $5\mu\text{g}$  de la bacteria *S. Typhimurim* y será la referencia comparativa con el agente a probar.
- Control positivo: que contiene la mezcla reactiva, los  $5\mu\text{g}$  de bacteria y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ )
- Testigo experimental colocando  $200\mu\text{l}$  de la mezcla que contiene ya el extracto, con las bacterias y con la mezcla reactiva a las 96 pozos

Una vez hecho esto la placas se tapan y se sellan con parafilm para evitar su evaporación, así mismo se introducen a una bolsa de plástico sellable y se llevan al autoclave a  $37^\circ\text{C}$  por 5 días.

Para el análisis de los resultados, se deberá observar el control de esterilidad en donde toda la placa debe estar de color morado indicando que no hay contaminación y la prueba es confiable. Se harán lecturas visuales contabilizando en las demás placas, los pozos que hayan cambiado del color morado al amarillo, esos se toman como positivos, las lecturas se hacen los días 3, 4, 5 y 6. Los resultados se analizan a través de un macro diseñado en Excel<sup>®</sup> provisto por el fabricante donde obtiene el grado de significancia.

### **5.27 Ensayo Rojo Neutro de Citotoxicidad Fibroblástica**

La actividad citotóxica in vitro del extracto de *Fluorensia cernua* para predecir los efectos tóxicos en las células se determinó mediante el ensayo de captación de rojo neutro descrito por Borenfreund (1985) a partir de la respuesta de la línea celular en cuanto a su viabilidad después de exponerse al agente antimicrobiano.

La línea celular normal adherente empleada fue de fibroblastos humanos ATCC: CRL-2522.

#### Descongelación y propagación celular

La línea celular CRL-2522 esta conservada en nitrógeno a -190°C, por lo que primeramente fue necesario descongelarla en condiciones óptimas de esterilidad en una campana de flujo laminar clase II (LABCONCO<sup>®</sup>), pasando el contenido del criovial a un tubo para centrifuga estéril y se agregaron 9 ml de

PBS (buffer de fosfatos salinos) a pH de 7.4, para centrifugarlo a 1500 rppm/ 5 minutos.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en tubos plásticos cónicos de 5 ml adicionadas con medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Esencial Medium Eagle) (Gibco®) con una concentración final de suero fetal bovino de 10%. La suspensión celular se transfirió a un frasco de cultivo T-25 y se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de humedad controlada compuesta por 95% O<sub>2</sub> Y 5 % de CO<sub>2</sub> en una incubadora con control de CO<sub>2</sub> (SHE L LAB® modelo TC2323).

El DMEM es un medio ampliamente usado para el crecimiento de células delicadas como los fibroblastos, neuronas y células gliales; contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que la fórmula original, y se realizaron 8 lavados bajo centrifugación con suero salino tamponado o buffer en fosfatos (PBS) (Gibco®), esta solución acuosa contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, su osmolaridad es isotónica y es semejante al líquido extracelular y no modifica el perfil de expresión y función de las células; esto se realiza dentro de la campana de flujo laminar clase II (LABCONCO®) como el medio de cultivo no tiene lípidos, proteínas ni factores de crecimiento, requiere ser suplementado con 10 % de FBS (suero bovino fetal inactivado) y emplear bicarbonato de sodio como sustancia buffer (3.7g/l) para mantener el pH fisiológico (7.6).

Una vez obtenido el crecimiento y proliferación adecuada de fibroblastos hasta alcanzar la confluencia del 95%, que lleva alrededor de 7 a 10 días, realizando un cambio de medio cada 48 horas, según el tiempo requerido; se retira el medio de cultivo con la ayuda de una micropipeta y se agregan 2 ml de PBS con micropipeta para retirar la monocapa formada por las células adheridas al frasco de cultivo. Se retiró el buffer y se agregó 1ml de tripsina al 0.25% con 1 mM de EDTA y se incubó a 37°C por 5 a 7 minutos con la intención de despegar las células del frasco. Una vez transcurrido el tiempo, se observó el frasco de cultivo en un microscopio invertido para confirmar la disgregación de la monocapa. Se adicionaron 2 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina y se procedió al conteo celular.

#### Conteo celular

Para el conteo celular se tomo una alicuota de 10µl y se transfirió a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, además se agregaron 10µl de azul de tripán al 0.4% para diferenciar las células viables de las no viables. De esta mezcla, se pasaron 10µl a una cámara de Neubauer para realizar el conteo en cuatro cuadrantes. Se promedia el conteo de los cuatro y se multiplica por dos (factor de dilución por la mezcla con azul de tripán) y el resultado se multiplica por 10,000; el resultado de esto, nos da el número de células por ml de la suspensión celular. Se realizan los cálculos adecuados para poder inocular la cantidad de células necesarias por pozo, según sea necesario.

Se colocaron a una concentración de  $5 \times 10^5$  (500,000 cel/pozo) en una microplaca de 24 pozos y para leer su absorbancia a una longitud de onda de 560nm utilizando un lector de placas marca Biorad® modelo 550.

Se dejaron incubar por 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### Determinación de la viabilidad celular con rojo neutro

Pasado el tiempo de incubación se colocaron por triplicado las sustancias a evaluar como lo son; el extracto de *Fluoensia cernua* a concentraciones de 100 y 50 µg/mL, utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Laboratorios), la clorhexidina al 0.12% (Consepsis-Ultradent®), así como el solvente del extracto (metanol y agua bidestilada) al 2% en solución salina buffer de fosfato de Dulbecco (PBS) como control negativo y células con medio de cultivo como el control positivo. En volúmenes de 100 µl. por 24 horas de exposición.

Se dejaron incubar durante 24 horas bajo las mismas condiciones, posteriormente se retiró el medio contenido de las muestras y se lavó con PBS y se sustituyó con 100 µl de una solución de rojo neutro RN (Sigma Chemical®) en medio DMEM (0.5 %), se dejó incubar durante 3 horas, para permitir la captación del colorante por parte de las células viables; pasado este tiempo, el medio de cultivo con rojo neutro se retiró y los pozos se lavaron con

formaldehído 0.5%, el formaldehído se descartó y se agregaron 200 µl de una solución de etanol al 50% con la solución desteñidora Ácido acético glacial al 1 % (CTR Scientific®), con la finalidad de extraer el colorante retenido por las células.

Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia en un lector de microplacas a 560 nm para obtener la cantidad de células vivas.

La cantidad de colorante retenido es directamente proporcional a la absorbancia y a la cantidad de células vivas; es decir, a mayor absorbancia mayor viabilidad celular.

El porcentaje de viabilidad se calculó a partir de la ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \left( \frac{\text{ABS}_{\text{ctr}} - \text{ABS}_{\text{trat}}}{\text{ABS}_{\text{ctr}}} \right) \times 100$$

Donde:

ABS<sub>ctr</sub> = Absorbancia de células no tratadas

ABS<sub>trat</sub> = Absorbancia de células tratadas con muestras.

El fundamento de la técnica, se basa en la conversión del colorante resazurin para medir la capacidad metabólica de la célula, es decir las células viables poseen la habilidad de reducir la resazurin (azul) a resorufin (tonalidades rosa-morado) mediante enzimas mitocondriales, citosólicas y

microsomales, por lo que las células no viables no reducen el colorante, de acuerdo al protocolo en concentraciones de 50 y 100 µg.

Los resultados son expresados como porcentaje de citoprotección. Un aumento en el porcentaje de citoprotección de *Flourensia cernua* oxidante respecto a los porcentajes de las muestras individuales, indica citoprotección, se considera el extracto seguro, lo que se traduce en bajo efecto citotóxico para las dos concentraciones en estudio.

Control	% de Citoprotección
<i>Flourensia cernua</i> 50 µg	98.83 %
<i>Flourensia cernua</i> 100 µg	97.89 %

Tabla . Resultados del efecto citoprotector en la línea celular normal adherente de fibroblastos humanos CRL-2522.

En cuanto al ensayo de Rojo Neutro descrito por Borenfreund and Puerner (1984) es un procedimiento simple y sensible para la búsqueda de agentes citotóxicos en monocapas de líneas celulares adherentes, basado en la incorporación del colorante supravital rojo neutro en los lisosomas de las células

viables, por lo que los cambios en la acumulación y retención de dicho colorante implica un daño en las membranas celulares, es un ensayo ampliamente utilizado. Para el presente estudio, se planificó la utilizando de la línea normal adherente de fibroblastos humanos, las viabilidades obtenidas para el extracto de *Fluorensia cernua* indican que no es citotóxico.

Los resultados de su citotoxicidad en la línea celular normal adherente de fibroblastos humanos CRL-2522 indica que ante un efecto citoprotector por arriba del 97%, resulta un bajo efecto citotóxico, por ende los resultados generales del presente trabajo son favorables ante el hecho de que los extractos evaluados se consideran seguros.

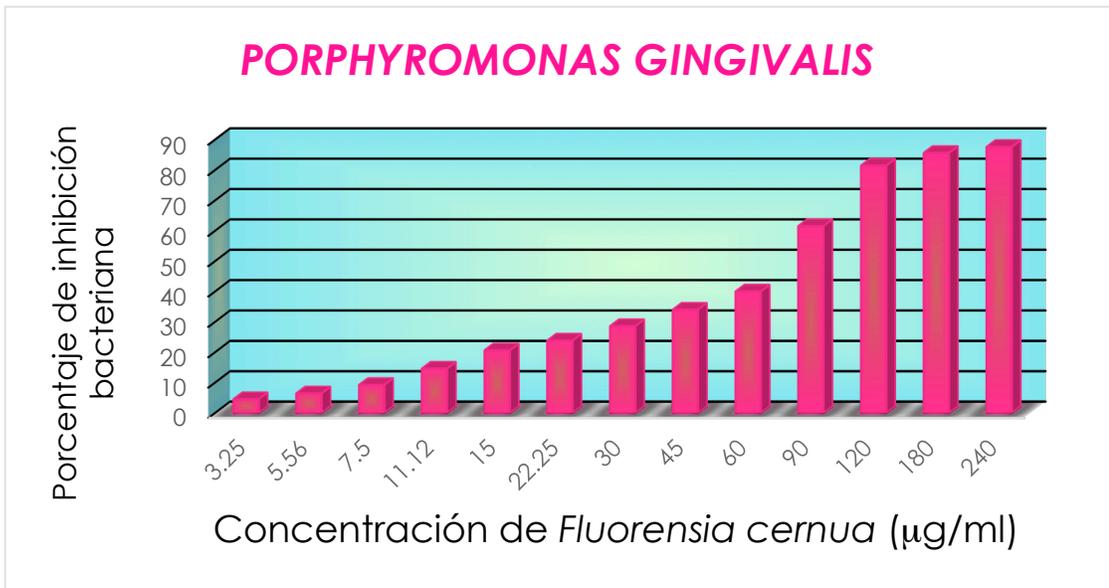
Adicionalmente, requerirán de estudios complementarios para que cumplan con las especificaciones físicas y químicas de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2001) y Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2006) para el uso seguro e inocuo cómo materia prima herbolaria, ya que al cumplir con estos parámetros establecidos podrían ser potencialmente propuestos como ingrediente funcional o en la formulación de fito-fármacos, ya que resulta un recurso de producción constante de compuestos activo

## 6. RESULTADOS

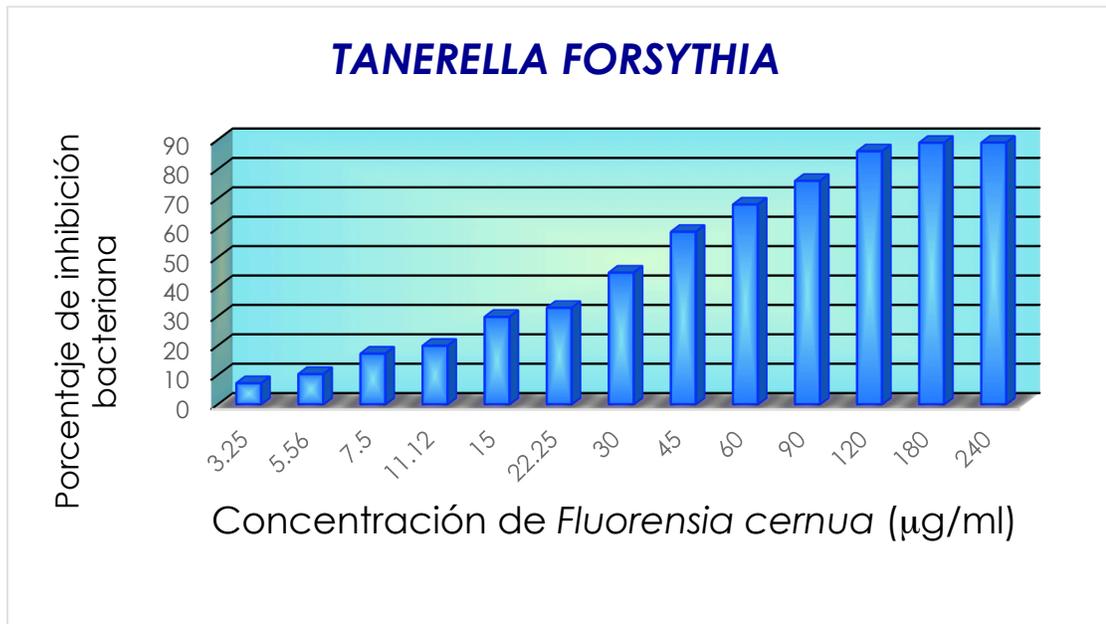
El efecto antimicrobiano de *Fluorensia cernua* fue eficaz contra los tres microorganismos evaluados en esta investigación *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius* y *Tanerella forsythia*.

En cuanto a los microorganismos incluidos en este estudio, se corroboró que *Porphyromonas gingivalis* fue la cepa más resistente al empleo del extracto; mientras que *Streptococcus intermedius* fue la cepa más sensible al empleo de *F. cernua*; incluso mostró mayor halo de inhibición el extracto que la clorhexidina al 0.12% siendo de 26.66 mm y 17 mm respectivamente  $P < 0.001$  lo cual es estadísticamente significativo

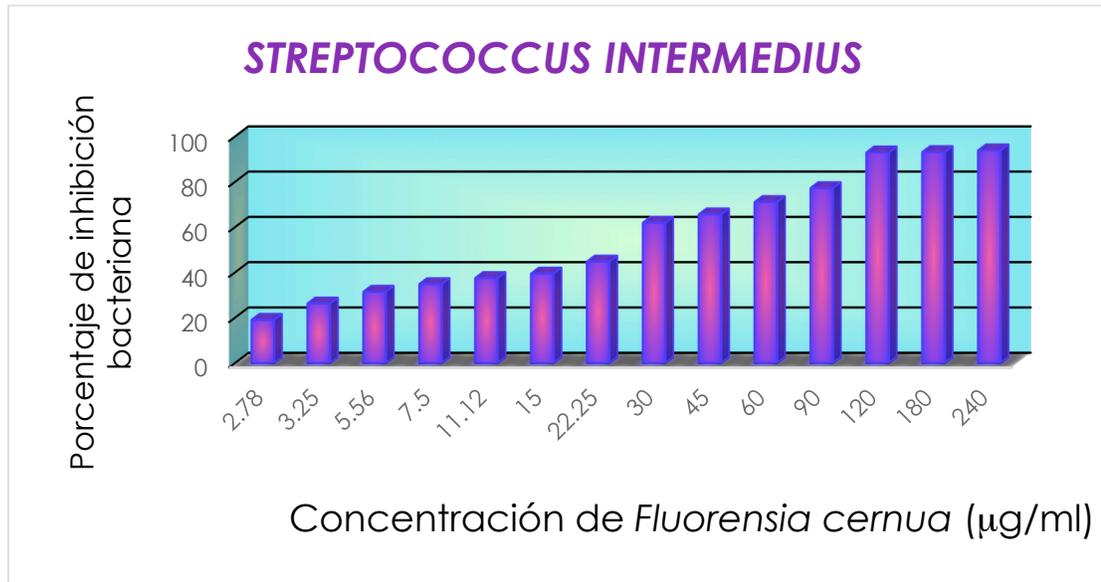
La concentración mínima inhibitoria de *Fluorensia cernua* para estas tres bacterias de estudio fue de 120ug/ml. (Gráfica 1,2,3)



Gráfica 1. Concentración mínima inhibitoria para *P. gingivalis*

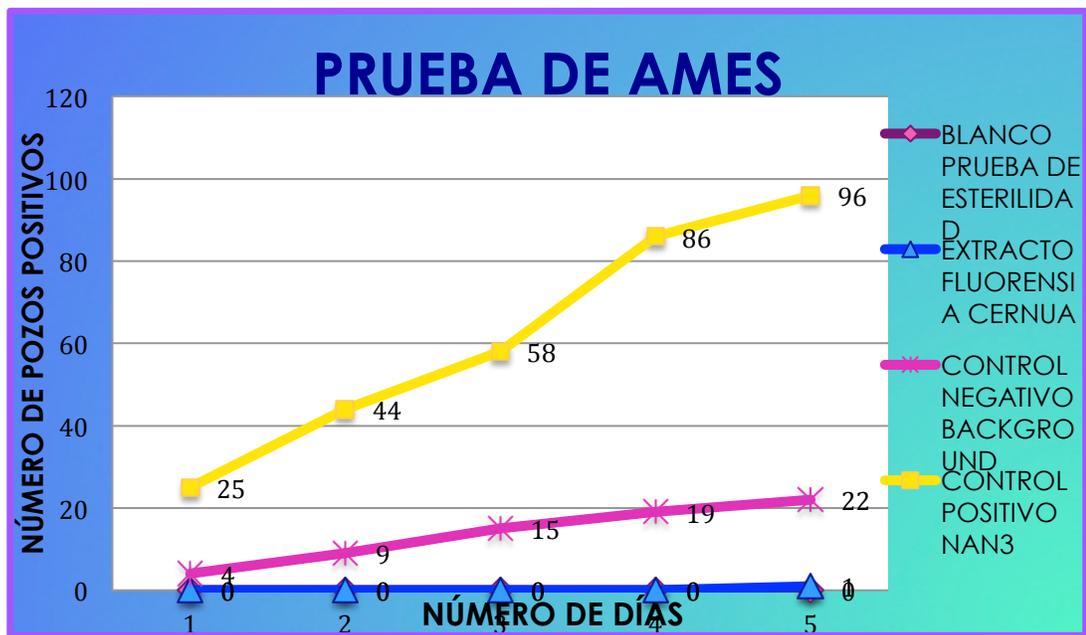


Gráfica 2. Concentración mínima inhibitoria para *Tanerella forsythia*



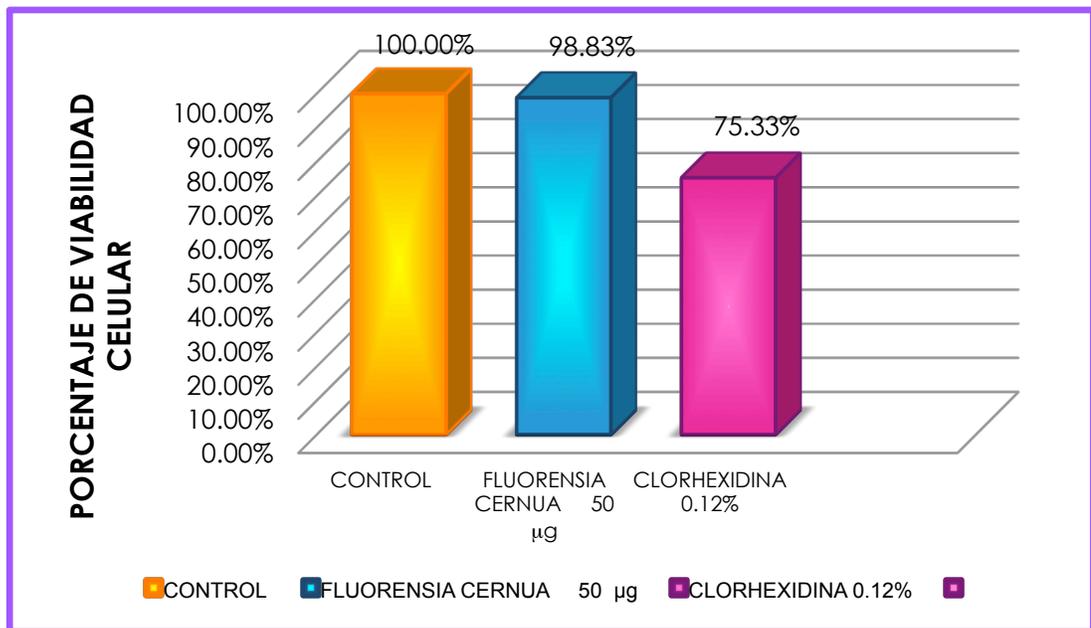
Gráfica 3. Concentración mínima inhibitoria para *St. intermedius*

En cuanto a la mutagenicidad mediante la prueba de Ames para el extracto de *Fluorensia cernua* se concluyó por medio de las lecturas que el extracto a evaluar no genera mutación ya que se ubicó por debajo del control positivo y background. (Gráfica 4)



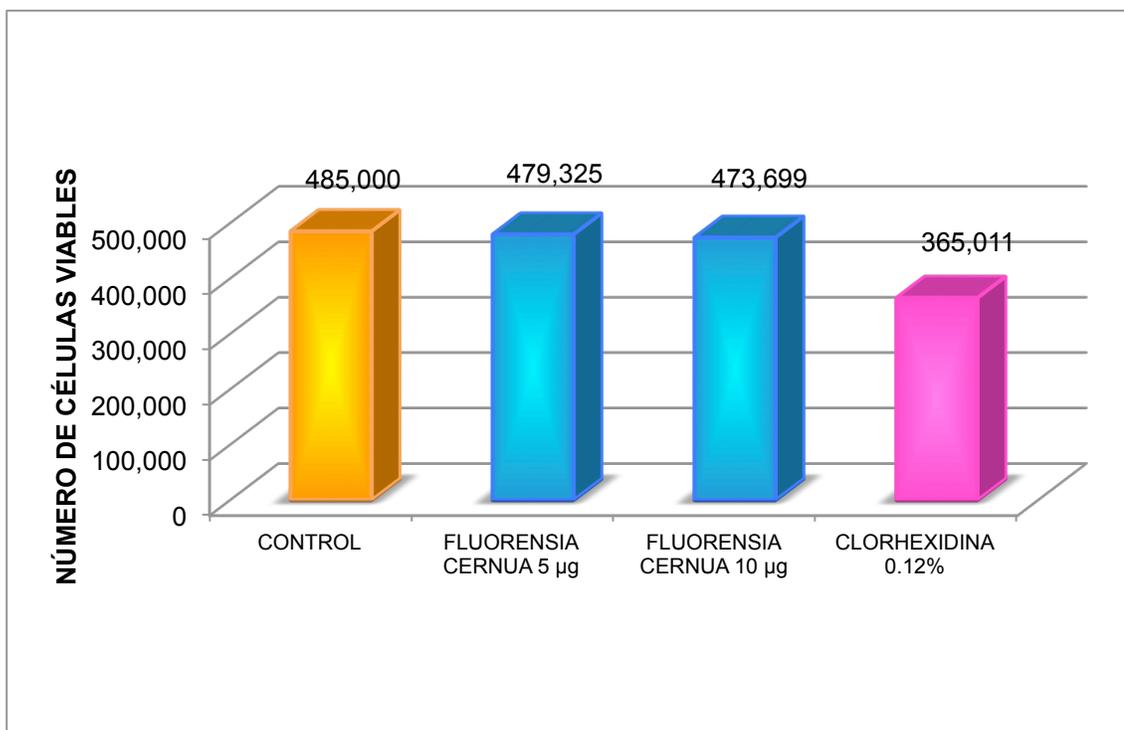
Gráfica 4. Prueba de Ames de mutagenicidad para el extracto *Fluorensia cernua*

Al llevar a cabo el ensayo de rojo neutro para evaluar la citotoxicidad en fibroblastos humanos se observó que el extracto de *Fluorensia cernua* no causa daño celular, por lo que se considera seguro, ya que obtuvo valores de 98.82% de viabilidad celular; a diferencia de la clorhexidina al 0.12% con la que fue comparada que sí tiene cierta toxicidad ante fibroblastos del 75.33%. (Gráfica 5).



Gráfica 5. Ensayo Rojo Neutro porcentaje de viabilidad fibroblástica del extracto de *F. cernua* versus clorhexidina al 0.12%

Empleando la *Fluorensia cernua* como antimicrobiano se contabilizaron 114,314 fibroblastos más, que en comparación con la utilización de clorhexidina al 0.12%, lo que indica seguridad para las células del huésped, ya que representa un 23.85% más células que con el digluconato de clorhexidina empleado actualmente. (Gráfica 6)



Gráfica 6. Viabilidad celular en fibroblastos mediante la exposición de *F. cernua* y clorhexidina

Este es el comienzo de nuevas líneas de investigación que ponen en manifiesto la utilización de nuevos productos antimicrobianos que podrían ser utilizados en un futuro como agentes terapéuticos de acción tópica directa en la boca para el tratamiento y prevención de enfermedades estomatológicas y reemplazar así los productos comerciales usados actualmente que poseen efectos adversos como en el caso de la clorhexidina; que es un agente antimicrobiano potencial y efectivo; pero es costosa, pigmenta dientes y dorso de la lengua y ocasiona alteraciones en el sentido del gusto, además de generar más acumulo de sarro en las superficies dentales.

## 7. DISCUSIÓN

Los microorganismos seleccionados para esta investigación son considerados indicadores de la enfermedad periodontal y los más importantes dentro del surco gingival, ya que se encuentran en cantidades elevadas en los sitios activos de las lesiones periodontales. Además de inducir riesgos en la salud general del paciente por su facilidad de invadir y entrar al torrente sanguíneo ocasionando endocarditis bacteriana y enfermedades coronarias.

De acuerdo a Newman en su reporte del 2008, asegura que cerca de más de cien nuevos antimicrobianos han sido aprobados en el período de 1981-2006 de los cuales el 70% son originados de plantas y el 21% de los agentes antifúngicos también.

Los resultados mostrados en este estudio, en donde se mide el potencial de compuestos activos de *Fluorensia cernua* para inhibir el crecimiento de estos microorganismos provee información nueva y alentadora para el ámbito odontológico motivando a nuevos estudios contra estas bacterias tan importantes; no sólo por las repercusiones orales que generan, sino por la asociación con diversas enfermedades sistémicas. El siguiente paso sería el aislar las moléculas activas de cada fracción que promuevan la actividad antimicrobiana eficaz.

Wolinsky et al en 1996, evaluaron el extracto acuoso de la corteza de *Azadirachta indica* (neem); en este se determinó la presencia de taninos y la inhibición de *streptococos* orales que promueven la formación de placa dentobacteriana.

Rodríguez-García et al en el 2010 realizaron un estudio en centroamerica con *Croton lechleri* conocida como Sangre de drago o sangre de grado, donde evaluaron *in vitro* el efecto antimicrobiano usando como vehículo dos copolímeros para comparar sus efectos contra *porphyromonas gingivalis*; un copolímero de estudio fue el quitosan y el otro el pululano; los resultados fueron contrastados contra bacterias periodontopatógenas mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) presentando inhibición en ambos materiales y siendo mayor en la película del quitosan.

Karuppiah en el 2012 evaluo la capacidad antibacterial de *Allium sativum* (ajo) y *Zingber officinale* (jengibre) contra microorganismos patógenos entre ellos *Pseudomona aeruginosa* con una concentración mínima inhibitoria de 67 µg/ml al ser ser expuesto al gengibre y para *Enterobacter sp.* de 110 µg/ml al exponerse al ajo.

Jung-Hyun et al en el 2014 analizan 558 extractos de plantas para probar su actividad antibacteriana contra bacterias periodontopatógenas; de esas sólo 10 mostraron efectividad contra *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*; *Pittosporum tobira* fue la planta que mejores resultados obtuvo

contras las tres bacterias experimentales; evaluaron también su concentración mínima inhibitoria siendo de 200 µg/ml.

No solamente se han reportado estudios de extractos de plantas como antimicrobianos para las bacterias periodontales, sino tambien se ha evaluado dicha eficacia contra casos de cancer oral; donde por la supresión del sistema inmunológico de dichos pacientes son mas suceptibles a infecciones secundarias orales siendo la bacteria más frecuentemente encontrada *Staphylococcus aureus* (23.2%), *Escherichia coli* (15.62%) *Candida albicans* (14.6%). En este reporte se evaluaron ocho plantas medicinales que mostraron actividad antimicrobiana significativa ( $P < 0.05$ ).

Otro estudio relacionado es el de Gomashe (2014) donde se analizó el extracto de *Psidium guajava* (guayaba) para evaluar su actividad antibiofilm contra *Streptococcus mutans*; siendo altamente eficaz. Lo cual sugiere resultados alentadores ya que *S. mutans* es un agente clave en la formación del biofilm de la placa dental y en la caries.

También Karygianni en ese mismo año 2014, evaluo los extractos de *Olea europaea* e *Inula viscosa*; plantas mediterráneas representativas contra bacterias anaerobias como *P. gingivalis*, *P.intermedia* y *F. nucleatum*, así como tambien contra *Candida albicans* obteniedo resultados prometedores como alternativa natural eficaz contra agentes infecciosos.

## 8. CONCLUSIONES

Después de haber llevado a cabo esta investigación, se concluye lo siguiente:

1. EL extracto metanólico de *Fluorensia cernua* posee actividad antimicrobiana eficaz contra las bacterias periodontales tales como: *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* y *Streptococcus intermedius*, evaluadas en este estudio.

2. La concentración mínima inhibitoria es de 120 µl para dichas bacterias siendo la mas sensible *Streptococcus intermedius* y la más resistente *Porphyrmonas gingivalis*.

3. Una vez corroborada la eficacia como antimicrobiano del extracto; se evaluó la seguridad clínica para su empleo, a través de la prueba de mutagenicidad de Ames para constatar que no pudiera incentivar cambio o mutaciones; ya que las mutaciones son asociadas a trastornos cancerígenos. Encontrando en este estudio que *Fluorensia cernua* no genera alteraciones.

4. En cuanto a la prueba de citotoxicidad, se llevo a cabo a través del ensayo rojo neutro para obtener la viabilidad celular en fibroblastos humanos ante a exposicion del extracto y de la clorhexidina, agente empleado

actualmente concluyendo que es mas seguro el empleo del extracto ya que genera un 98.83% de viabilidad en comparación con un 75.33% de la clorhexidina al 0.12%.

5. Estas líneas de investigación abren un panorama alentador ante el empleo de agentes naturales para la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal, generando adecuado control del biofilm bacteriano sin provocar daños al huésped durante su exposición; lo que brinda seguridad para continuar con estudios o ensayos experimentales que pudieran en un futuro emplearse como agentes tópicos diluidos.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Aislar las moléculas activas específicas de *Fluorensia cernua* responsables de la inhibición de crecimiento bacteriano para poder tener mejor efecto a menor dosis y más específico.
2. Combinar moléculas activas de otros extractos para incluir agentes antisépticos, antiinflamatorios y antiplaca para prevenir y tratar la enfermedad periodontal.
3. Motivar a investigaciones posteriores para la aplicación de otros extractos de plantas contra bacterias orales ya que existe muy poca literatura que reporte esta actividad contra los microorganismos de boca.
4. *Porphyromonas gingivalis* fue el microorganismo que mayor resistencia mostró al uso de antimicrobianos, esto da la pauta para mayores estudios en los que se pruebe con otras plantas y a diferente concentración sobre todo; por que este microorganismo es el mayor reportado en la literatura que genera afecciones sistémicas o relacionado con otras enfermedades.

## 10. LITERATURA CITADA

Ainamo, J.; 1992; "Significance of epidemiologic research in the understanding of periodontal disease"; Journal of Dental Research; Vol. 100; pp: 39.

Al-Katma MK et al; 2007; "Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis; J Clin Rheumatol; 13; pp.134-7

Alández, F.J.; Herrera, J.J.; Bascones, A; et al.; 1994; "Clasificación de las enfermedades periodontales"; Avances en Periodoncia; Vol. 6; pp: 9-20.

Alanís, G.J.; Cano y Cano, G.; Merino, R.M.; 1996; Vegetación y Flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica; México; Impresora Monterrey, S.A. de C.V.; pp: 168,190,211.

Alí, R.W.; Johannessen, A.C.; et al.; 1997; "Comparisson of the subgingival microbiota of periodontally health and diseased adults in Northen Cameroon"; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 24; No.11; pp: 830-835.

Almas, K.; Al-Zeid, Z.; 2003; "The inmediate antimicrobial effect of a toothbrush and miswak on cariogenic bacteria: a clinical study"; Plantas médicas; Vol. 69; No. 12; pp: 1159-1162.

Amano, Atsuo; 2003; "Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: Implication for the microbial pathogenesis of Periodontal disease"; Journal of Periodontology; Vol. 74; No.1; pp: 90-96.

Azmak, Nezh; Atilla, G.; et al.; 2002; "The effect of subgingival controlled-release delivery of chlorhexidine chip on clinical parameters and matriz metalloproteinase-8 levels in gingival crevicula fluid"; Journal of Periodontology; Vol.73; No.6; pp: 608-615.

Bairy, I.; Reeja, S.; et al.; 2004; "Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microflora based on *in vivo* studies"; Oral Microbiology Immunology; Vol. 19; No. 1; pp: 61-64.

Bascones, A.; Manso, F.J.; 1994; "Clorhexidina en odontoestomatología: Conceptos actuales y revisión de la literatura"; Avances en Odontoestomatología; Vol.10; pp: 685-708.

Bascones, A.; Manso, F.J.; 1995; "Aspectos clínicos del uso de la clorhexidina"; Avances en Odontoestomatología; Vol. 11 (Suppl B); pp: 145-158.

Beck, J.; Garcia, R.; et al.; 1996 ; "Periodontal disease and cardiovascular disease"; Journal of Periodontology ; Vol. 67 (suppl); pp: 1123-1137.

Beck, J.D.; Löe, H.; 1993; "Epidemiological principles in studying periodontal disease"; *Periodontology* 2000; Vol. 2; pp: 34.

Berezow AB, Darveau RP; 2011; "Microbial shift and periodontitis"; *Periodontology* 2000; 55; pp. 36-47.

Berns, Joel M.; 1993; *Understanding periodontal diseases*; Chicago, Illinois; Quintessence Publishing Co.; pp: 10,13,14.

Borenfreund E y Puerner JA. 1985. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicological Lett.* 24:119-124.

Brading, M.G.; Marsh, P.D.; 2003, "The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products"; *International Dental Journal*; Vol. 53; pp:353-362.

Bundeli N, et al; 2005; "Periodontal infections and pre-term low birth weight"; *J Clin Periodontol*; 32; pp.174-81

Campos F, Fabio A; 2010; "Toxicity of Chlorhexidine on odontoblast like cells"; *J Appl. Oral. Sci*; 18: pp. 1-14

Choi, B.K.; Park, S.H.; et al.; 2000 ; "Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach"; *Journal of Periodontology*; Vol. 71; pp: 1387-1394.

Christersson, L.A.; et al; 1992; "Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis"; *Journal of Periodontology*; Vol. 63; No.5; pp: 418-425.

Chun YH, Chun KR; 2005; "Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis"; *J Periodontal Res*; 40; pp.87-95.

Colombo, A.P.; Teles, R.P; Torres, M.C.; et al.; 2002; "Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis"; *Journal of Periodontology*; Vol. 73; pp: 360-369.

Cuenca, E.; Manau, C.; Serra, LL.; 1991; *Manual de Odontología Preventiva y Comunitaria* España; Ed. Masson, S.A.; pp: 3-12, 37-39,143-153, 191-199.

Dahlén, G.; Luan, W.M.; et al.; 1995; "Periodontopathogens in elderly chinese with different periodontal disease experience"; *Journal of Clinical Periodontology*; Vol. 22; No.3; pp: 188-200.

Dahlén, G.; Manji, F.; et al.; 1992 ; “Putative periodontopathogens in diseased and non-diseased persons exhibiting poor oral hygiene” ; Journal of Clinical Periodontology ; Vol. 19; No.1; pp: 35-42.

Darveau, R.P.; Tanner, A.; Page, R.C.; 1997; “The microbial challenge in periodontitis”; Periodontology 2000; Vol. 14; pp: 12-32.

DeStefano, F.; Anda, R.; et al.; 1993; “Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality”; British Medical Journal; Vol. 306; pp: 688-691.

Desvarieux M, et al.; 2005; "Periodontal micobiota and carotid intima-media thickness"; Disease Epidemiology Study; Vol.111; pp. 576-82.

Dissick A, Redman RS; 2010; "Association of periodontitis with rheumatoid arthritis; J Periodontol; 81; pp. 223-30.

Dye, B.; Kruszon-Moron, D.; McQuillan, G.; 2002 ; “The relationship between periodontal disease attributes and Helicobacter pylori infection among adults in the United States”; American Journal Public Health ; Vol. 92; pp: 1809-1815.

Faria G, Cardoso C; et al; 2009; " Chlorhexidine induced apoptosis pr necrosis in L929 fibroblast- A role for endoplasmic reticulum strress; Toxicology and applied phamacology; pp.256-265.

Fernández, R.; Sánchez, M.A.; 1989; “Plantas empleadas en México para el tratamiento de afecciones estomatológicas”; Revista Práctica Odontológica; Vol. 10; No. 6; pp: 25-30.

Fine, D.; 1995; “Chemical agents to prevent and regulate plaque development”; Periodontology 2000; Vol.8; pp: 87-107.

Flemming TF, Beikler T; 2001; "Control of oral biofilms"; Periodontol 2000; 55: pp. 9-15.

Geerts SO, Legrand V; 2004; "Further evidence association between periodontal conditions and coronary artery disease"; J Periodontol; 75: pp.1274-80.

Giannelli M, et al; 2008; " Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types- a molecular and ultrastructural investigation; Toxicology in vitro;22; 308-317.

Gomashe A, Sharma A.; 2014; "Investigation of biofilm inhibition activity and antibacterial activity of *Psidium guajava* plant extrtacts against *Streptococcus mutans* causing dental plaque"; Int J Curr Microbiol, App, Sci; 3(9); pp. 335-351.

Griffen, A.L.; Becker, M.R.; et al.; 1998; “Prevalence of *Porphyromonas*

*gingivalis* and periodontal health status”; Journal of Clinical Microbiology; Vol. 36; pp: 3239-3242.

Grosso, F.C.; Ramacciato, J.C.; et al.; 2002; “Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms”; Biotechnology and Biochemistry; Vol. 66; No. 4; pp: 921-924.

Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Tanner, A.; et al. ; 1998; “Subgingival microbiota in health well-maintained elders and periodontitis subjects”; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 25; No. 5; pp: 346-353.

Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.; 1994; “Microbial etiological agents of destructive periodontitis diseases”; Periodontology 2000; Vol. 5; pp: 78-111.

Hammer, K.A.; Dry, L.; et al.; 2003 ; “Susceptibility of oral bacteria to *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*”; Oral Microbiology and Immunology; Vol. 18; pp: 389-392.

Haraszthy, V.I.; Zambon, J.J.; Trevisan, M.; et al.; 2000; “Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques”; Journal of Periodontology; Vol. 71; No.10; pp: 1554-1560.

Harper, D.S.; Mueller, L.J.; Fine, J.B.; et al.; 1990; “Clinical efficacy of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride during 6 months of use”; Journal of Periodontology ; Vol. 61; No. 6; pp: 352-358.

Hellstrom, M.K.; Ramberg, P; et al.; 1996; The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in human periodontitis; Journal of Clinical Periodontology; Vol.23; No.10; pp: 934-940.

Holt SC, Ebersole JL;2005; "*Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*"; Periodontol 2000; 38: pp. 72-122.

Homer, K.A.; Manji, F.; Beighton, D.; 1992; “Inhibition of peptidase and glycosidase activities of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Treponema denticola* by plants extracts”; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 19; No. 5; pp: 305-310.

Howard, K.; Kuramitsu, In-Choi Kang; Minshan, Qi; 2003; “Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: Implications for cardiovascular diseases”; Journal of Periodontology; Vol. 74; No. 1; pp: 85-89.

Hujoel, P.P.; Drangsholt, M.; Spekerman, et al.; 2000; “Periodontal disease and coronary heart risk”; JAMA; Vol. 284; pp: 1406-1410.

Hutcherson JA, et al.; 2015; "Comparisson of inherently essential genes of *Porphyromonas gingivalis* identified in two transposon sequencing libraries". Mol

Oral Microbiol.pp: 765-789.

Hyun-Young, K.; et al.; 2002; "The effect of safflower seed extract on periodontal healing of 1-wall infrabony defects in beagle dogs"; Journal of Periodontology; Vol. 73; No. 12; pp: 1457-1466.

Iauk, L.; Bue A.M.; et al.; 2003; "Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria"; Phytotherapy Research; Vol. 74; No. 4; pp: 328-338.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática; 2000; Agenda estadística; Censo General de Población y Vivienda; SSP-México.

Jones, C.G.; 1997; "Chlorhexidine. Is it still the gold standard?" Periodontology 2000; Vol. 15; pp: 55-62.

Jung-Hyun Oh, et al; 2014; "Antimicrobial activities against periodontopathic bacteria of *Pittosporum tobira* and its active compound"; Molecules; 19; pp 3607-16.

Karupiah, P., Rajaram S; 2012; "Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens"; Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine; 597-601.

Koo, H.; Gomes, B.P.; Rosalen, P.L.; et al.; 2000; "In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens"; Arch. Oral Biol.; Vol. 45; pp: 141-148.

Kowolik, M.; Dowsett, S.; De la Rosa, M.; 2001; "Systemic neutrophil response resulting from dental plaque accumulation"; Journal of Periodontology; Vol. 72; No.2; pp: 146-151.

Kumar, P.S.; Griffen, A.L.; et al.; 2003; "New bacterial species associated with chronic periodontitis"; Journal of Dental Research; Vol. 82; No. 5; pp: 338-344.

Li, X.C.; Cai, L.; Wu, D.C.; 1997; "Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens" Journal of Phytochemistry; Vol. 46; No. 1; pp: 97-102.

Listgarten, M.A.; 1987; "Nature of periodontal diseases: Pathogenic mechanisms"; Journal of Periodontal Research; Vol. 22; pp: 172-178.

Löe, H.; Anerud, A.; Boysen, H.; 1992; "The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession"; Journal of Periodontology; Vol. 63; pp: 489-495.

Loesche, W.J.; 1996; "Antimicrobials in dentistry: with knowledge comes responsibility"; *Journal of Dental Research*; Vol. 75; pp: 1432-1433.

Loesche, WJ, Grossman N; 2001; "Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: Diagnosis and treatment"; *Clinical Microbiology Reviews*; 727-752.

Madianos PN, Beck JD; 2001; "Maternal periodontitis and prematurity. Part II:maternal infection ad fetal exposure; *Ann Periodontol*; 6; pp. 175-82.

Mandel, I.D.; 1988; "Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis"; *Journal of Clinical Periodontology*; Vol. 15; No.8; pp: 488-498.

Marsh PD, Moter A; 2011; "Dental plaque biofilm: communities, conflict and cotrol"; *Periodontol 2000*; 55: p.16-35.

Marsh, P.D.; 1992; "Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis"; *Journal of Dental Research*; Vol. 71; No. 8; pp: 1431-1438.

Martínez-Martínez RE, et al.; 2009; "Detection of periodontal bacteria DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients; *J Clin Periodontol*; 36; pp. 1004.10.

Mauriello, S.M.; Bader, J.B.; 1988; "6 months effects of sanguinaria dentrifice on plaque and gingivitis"; *Journal of Periodontolgy*; Vol.59; No. 4; pp: 238-243.

Mawardi HH, et al; 2015; "Current understanding of the relationship between periodontal and systemic diseases"; *Saudi Med J*;36; pp. 150-8.

Mercado RB, Marshall R, et al.; 2001; "Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis"; *J Periodontol*; 72: pp. 779-87.

Moen K, Brun JG, et al.; 2006; "Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNA´s; *Clin Exp Rheumatol*; 24; pp. 656-63.

Moore, L.F.; Moore, L.V.H.; 1994; "The bacteria of periodontal diseases"; *Periodontology 2000*; Vol. 5; pp: 66-77.

Moore, W.E.; Moore, L.H.; et al.; 1991; "The microflora of periodontal sites showing active destructive progression"; *Journal of Clinical Periodontology*; Vol. 18; pp: 729-739.

Nelson KE, Fleischmann RD, et al.; 2003; "Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium porphyromonas gingivalis strain W83"; *J. Bacteriol.* 185 (18): 5591–601.

Newman DJ; 2008; "Natural products as leads to potential drugs: an old process or new hope for drug discovery?"; J Med Chem; 51; 2589-99.

Newman, M.; Kornman, K.; 1990; Antibiotic/Antimicrobial use in Dental Practice; USA; Quintessence Publishing Co. pp: 94-97, 104-107.

Offenbacher, S.; Katz, V.; et al.; 1996 ; "Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight"; Journal of Periodontology ; Vol. 67 (Suppl); pp: 1103-1113.

Oliver, R.C.; Brown, L.J.; 1993; "Periodontal disease and tooth loss"; Periodontology 2000; Vol. 2; pp:117.

Osawa, K.; Matsumoto, T.; et al.; 1991; "Inhibitory effect of plant extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by *porphyromonas gingivalis* crude enzyme"; Tokyo Dental College; Vol. 32; No. 1; pp: 1-7.

Page, R.C.; 1991; "The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease"; Journal of Periodontal Research; Vol. 26; pp: 230-242.

Panghal, M et al; 2011; In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against isolates of oral cancer cases"; Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials; 10; 1-11.

Paster, B.J.; Boches, S.K.; et al.; 2001 ; "Bacterial diversity in human subgingival plaque"; Journal of Bacteriology ; Vol. 183; pp: 3770-3783.

Personn R, Yeates J, et al; 2007; "The impact of a low frequency chlorhexidine rinsing schedule on the subgingival microbiota"; J Periodontol; 78; pp, 1751-78.

Persson, G.R.; 2012; "Rheumatoid arthritis and periodontitis-Inflammatory and infectious connections. Review of the literature"; Journal of Oral Microbiology; Vol 4; pp 1-16.

Pischon N, et al; 2008; Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis.; J Periodontol; 79; pp. 979-86.

Pussinen PJ, et al; 2003; "Antibodies to periodontal pathogens are associated with coronary heart disease"; Arterioscler Thromb Vasc Biol; 23; pp. 1250-4.

Ranney, R.R.; 1993; "Classification of periodontal diseases"; Periodontology 2000; Vol. 2; pp: 13.

Rodenburg, J.P.; y cols; 1990; "Ocurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in progressive periodontal disease in relation to age and treatment history"; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 17; No. 6; pp: 392-399.

Sánchez, Lamar; Fonseca, G.; et al.; 2000; "Plantas medicinales"; Revista Cubana farmacológica; Vol. 31; No.1; pp: 34-43.

Sandros, J.; Papapanou, P.; Dahlén, G.; 1993 ; "*Porphyromonas gingivalis* invades oral epitelial cells in vitro"; Journal of Periodontal Research; Vol. 28; No. 3; pp: 219-226.

Sato, K.; Yoneyama, Y.; et al.; 1993; "The effect of subgingival debriment on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota"; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 20; No.5; pp: 359-365.

Savoia D; 2012; "Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics"; Future Microbiol; 7(8); pp. 979.990.

Schäfer AS, et al; 2011; "Periodontal genetics a decade of genetic association studies mandates better study designs"; J CIn Periodontol; 38: pp. 103-07.

Sean, Lee; Wu, Zhang; Yiming, Li; 2004; "The antimicrobial potencial of 14 natural herbal dentifrices"; The Journal of American Dental Association; Vol. 135; pp: 113-1141.

Serfaty, I.J.; 1988; "Comparative trial with natural herbal mouthwash versus chlorhexidine in gingivitis"; Journal of Clinical Dentistry; Vol. 1; A:34.

Seymour GJ et al; 2007; "Relationship between periodontal infections and systemic disease"; Clin Microbiol Infect; 13; pp. 3-10.

Shan, H.N.; Collins, M.D.; 1988; "Proposal for reclassification of *Bacteroides assaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*"; International Journal Sys Bacteriology; Vol. 38; pp: 128-135.

Shapiro, S.; Meier, A.; Guggenheim, B.; 1994; "The antimicrobial activity of essencial oil components towards oral bacteria"; Oral Microbiology Immunology; Vol. 9; pp: 202-208.

Slots J, Slots H; 2011; "Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk"; Periodontol 2000; 55: 48-69.

Slots, J.; Bragd, L.; Dahlén, G.; et al.; 1986 ; "The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in

destructive periodontal disease in adults”; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 13; No. 6; pp: 570-577.

Slots, J.; Listgarten, M.A; 1988; “*Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 15; pp: 85-93.

Smulow, J.B.; Turesky, S.S.; Hill, R.G.; 1983; The effect of supragingival plaque removal on anaerobic bacteria in deep periodontal pocket; JADA; Vol. 107; No. 5; pp: 737-742.

Sockansky, S.S.; Haffajee, A.D.; 1997; The nature of periodontal diseases; Ann of Periodontology; Vol. 2; No.1; pp: 3-10.

Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; et al.; 1998; “Microbial complexes in subgingival plaque”; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 25; No. 2; pp: 134-144.

Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.;1993; Effect of therapy on periodontal infections; Journal of Periodontology; Vol. 64 (Suppl); pp: 754-759.

Taboada, Olga; 2000; “Prevalencia y severidad de la enfermedad parodontal”; Dentista y Paciente, Vol. 8; No.9; pp:10-16.

Takarada, K.; Kimizuka, R.; et al.; 2003; “A comparisson of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens”; Plantas medicinales; Vol. 69; No. 7; pp: 623-627.

Termentzi A; Fokialakis, N; 2011; "Natural resins and bioactive natural products thereof as potential antimicrobial agents"; Curr Pharm Des; 17; p. 1267-1290.

Tezal M, et al; 2007; "The relationship between bone minral density and periodontitis in postmenopausal women"; J Periodontol; 71; pp. 1492-1498.

Tran, S.; Rudney, J.; et al.; 1997; “Persistence presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis”; Journal of Periodontology; Vol. 72; No.1; pp: 1-10.

Wolff, L.F.; Aeppli, D.M.; et al.; 1993 ; “Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease”; Journal of Clinical Periodontology ; Vol. 20; pp: 699-706.

Ximénez-Fyvie, L.A.; Haffajee, A.D.; et al.; 2000 ; “Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis”; Journal of Clinical Periodontology; Vol. 27; No.8; pp: 648-657.

Zambon, J.J.; 1996; "Periodontal diseases. Microbial factors"; Ann Periodontology; Vol. 1; pp: 879-925.

Zanatta F., Antoniazzi, R; 2007; "The effect of 0.12% Chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque free and plaque-covered surfaces"; J Periodontol; 78: pp. 2127-34.

Zerón, Agustín; 1998; "La verdadera utilidad de los enjuagues bucales"; Dentista y Paciente; Vol. 6; No.72; pp: 50-51.

Ziebolz D et al; 2011; "Clinical periodontal and microbiologic parameters in patient with rheumatoid arthritis"; J Periodontol; 82; pp. 1424-28.