

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



**EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS  
DE PLANTAS CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS  
PULPARES**

**POR**

**JESSICA PATRICIA ARELLANO BARRIENTOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE  
ENDODONCIA**

**OCTUBRE, 2016**

(Maestría)

**EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA  
DE EXTRACTOS DE PLANTAS CONTRA  
MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES**

**Dirección de Tesis**

---

Director de la tesis

---

Co Director de la tesis

---

Asesor metodológico

---

Asesor estadístico

**“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE  
PLANTAS CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES”.**

**Dirección de Tesis**

---

Director de la tesis

---

Director externo

---

Asesor externo

**“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE  
PLANTAS CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES”  
APROBACIÓN DE LA TESIS**

LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN Y  
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA LA MISMA; COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA.

**HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO**

**PRESIDENTE**

**SECRETARIO**

**VOCAL**

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	vii
DEDICATORIA.....	viii
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	3
3.OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES .....	5
4.1 Pulpa dental y necrosis.....	5
4.2 Infecciones pulpares y los principales microorganismos implicados.....	6
4.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	6
4.2.2 <i>Tanerella forsythia</i> .....	7
4.2.3 <i>Porphyromonas endodontalis</i> .....	8
4.2.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	8
4.3 Tratamiento de endodoncia y uso de antimicrobianos.....	9
4.3.1 Hipoclorito de sodio.....	10
4.3.2 Clorhexidina.....	10
4.4 Fitoterapia en Odontología.....	11
4.4.1 <i>Schinus molle</i> .....	12
4.4.2 <i>Leucophyllum frutescens</i> .....	13
4.4.3 <i>Heliopsis longipes</i> .....	13
4.4.4 <i>Juglans mollis</i> .....	14
4.5 Obtención de extractos.....	14
4.6 Citotoxicidad.....	15
5. MARCO DE REFERENCIA.....	17
6. MÉTODOS.....	21

6.1 Obtención de las plantas de estudio .....	21
6.2 Preparación de los extractos.....	21
6.3 Pruebas de solubilidad.....	23
6.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos contra los microorganismos prueba.....	23
6.4.1 Microorganismos de prueba.....	23
6.4.2 Preparación de diluciones.....	24
6.4.3 Prueba antimicrobiana preeliminar mediante sensidisco.....	25
6.4.4 Prueba antimicrobiana en pozo .....	26
6.4.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	27
6.4.5.1 Preparación de las diluciones de los extractos activos.....	27
6.4.5.2 Determinación de la CMI mediante difusión en agar por pozo.....	28
6.4.5.3 Evaluación antimicrobiana de la formulación con extracto activo y el principal agente antimicrobiano.....	29
6.5 Evaluación de citotoxicidad.....	30
6.6 Análisis fitoquímico.....	31
6.6.1 Identificación taxonómica del principal extracto activo.....	31
6.6.2 Caracterización del extracto con mayor actividad por cromatógrafo de gasas masas.....	31
7. RESULTADOS .....	32
8. DISCUSIÓN.....	42
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
10. APÉNDICES .....	51
11. LITERATURA CITADA .....	58

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme tantas bendiciones toda mi vida, por permitirme cumplir mis sueños, por darme fuerza y sabiduría en cada momento.

A mis padres y mi esposo, que todo el tiempo han sido motivación y han creído en mí en cada proyecto que he emprendido. Gracias por permitirme superarme y hacer todo por verme feliz.

A mi directora de Tesis, maestra y amiga, Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis, por cada enseñanza, por su tiempo y dedicación en este y en tantos proyectos. Gracias por darme tantas oportunidades y confiar en mí.

A mi co-director de Tesis, Coordinador de posgrado y ejemplo a seguir, Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, gracias por permitirme aprender del mejor, por sus consejos y por esforzarse día a día por hacernos mejores profesionistas, pero sobretodo, mejores humanos.

A mis asesores externos, Dr. Abelardo Chavez Montes y Dr. Ezequiel Viveros Valdez, por aceptar el reto de combinar la odontología con el área de la fitoterapia, por cada explicación, tiempo y paciencia.

A las doctoras Idalia Rodríguez, Mayra Martínez y Elizabeth Madla, por destinar parte de su tiempo y atención a la revisión y mejora de este proyecto, gracias por cada observación y consejo.

A los doctores Claudio Cabral, René Hernández y Casiano del Ángel Mosqueda gracias por toda su ayuda, su tiempo y paciencia al explicarme, así como permitirme usar sus instalaciones.

A CONACYT, por creer en los jóvenes e impulsar la investigación en México aportándome una beca económica para la realización de este proyecto.

A mi amiga QBP Vilma Suarez, por cada momento estar al pendiente de mí, motivarme a mejorar, a alcanzar grandes metas, por estar a mi lado en cada momento de este proyecto y de muchos más.

A Él.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser quien guía mi camino y me ha permitido llegar hasta hoy.

A mis padres y hermanos, gracias por todo el tiempo ser mi base, por enseñarme que los sueños se cumplen y las metas se alcanzan.

A mi compañero de vida, amor de mi vida y mejor amigo: Emmanuel gracias por darme tanto, por impulsarme y creer en mí.

A mis hermanos del corazón, gracias por tanto Ενοσ.

Y a Él, aunque ya no estás, vivirás siempre en mi corazón.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Prueba de solubilidad.....	33
II. Promedio de halos de inhibición presentados por la concentración al 10%.....	34
III. Promedio de halos de inhibición presentados por la concentración al 5%.....	35
IV. Promedio de halos de inhibición presentados por la concentración al 2.5%.....	36
V. Promedio de halos de inhibición mediante difusión en pozo de la concentración al 10%.....	36
VI. Promedio de halos de inhibición mediante difusión en pozo de la concentración al 5%.....	37
VII. Promedio de halos de inhibición mediante difusión en pozo de la concentración al 2.5%.....	37
VIII. Análisis en parejas de Fisher (LSD) para evaluación antimicrobiana de la formulación contra <i>E. faecalis</i> .....	38
IX. Análisis en parejas de Fisher (LSD) para evaluación antimicrobiana de la formulación contra <i>P. gingivalis</i> .....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
FIG1 Hojas de pirul.....	21
FIG2 Hojas de cenizo.....	21
FIG3 Corteza de nogal.....	21
FIG4 Raíz de chilcuague.....	21
FIG5 Planta molida.....	21
FIG6 Pesaje de la planta.....	22
FIG7 Se colocó planta en contacto con solvente.....	22
FIG8 Colocación de barra magnética.....	22
FIG9 24 horas en placa de agitación sin calor.....	22
FIG10 Rotoevaporador.....	22
FIG11 Ajuste de matraz.....	23
FIG12 Material usado para prueba de solubilidad.....	23
FIG13 Observación de prueba de solubilidad.....	23
FIG14 Medios de cultivo Müeller Hinton en caldo y agar.....	24
FIG15 Diluciones del extracto de pirul.....	24
FIG16 Material empleado para prueba antimicrobiana en sensidisco.....	25
FIG17 Siembra del microorganismo problema.....	25
FIG18 Sensidisco impregnado con el extracto problema.....	25
FIG19 Colocación de sensidiscos en caja de Petri marcada anteriormente.....	26
FIG20 Inoculación del extracto en el pozo.....	27
FIG21 Cajas de Petri luego del procedimiento.....	27

FIG22 Confección de los pozos de 7 mm de diámetro.....	28
FIG23 Triplicado luego de la inoculación de las diluciones prueba.....	29
FIG24 Triplicado luego de la inoculación de los controles y las mezclas activas.....	30
FIG25. Evaluación de la citotoxicidad de <i>S. Molle</i> por técnica de FMCA.....	30
FIG26. Difusión en agar en pozo: Inhibición del crecimiento de <i>P. gingivalis</i> por el extracto de Pirul.....	36
FIG27. Determinación de la CMI del extracto de Pirul sobre <i>P. gingivalis</i> .....	37
FIG28. Determinación de la CMI del extracto de Pirul sobre <i>E. faecalis</i> .....	38
FIG29. Evaluación antimicrobiana de la mezcla activa sobre <i>E. faecalis</i> .....	38
FIG30. Evaluación antimicrobiana de la mezcla activa sobre <i>P. gingivalis</i> .....	38
FIG31. Observación de viabilidad celular por medio de fluorescencia a diversos periodos de tiempo.....	39
FIG32. Observación de viabilidad celular por medio de fluorescencia a diversas concentraciones.....	40
Gráfico 1. Promedio de halos de inhibición de la mezcla activa a las 48 horas.....	39
Gráfico 2. Citotoxicidad sobre fibroblastos gingivales humanos.....	40

## NOMENCLATURA

Abs absorbancia

g gramos

mg miligramos

μg microgramos

μl microlitros

UV ultravioleta

nm nanómetros

CMI concentración mínima inhibitoria

## RESUMEN

**Nombre:** Jessica Patricia Arellano Barrientos

**Fecha de Graduación:** 14 de julio de 2016

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Odontología**

**Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia**

**Páginas:**

**Título del Estudio:** Evaluación antimicrobiana y citotóxica de extractos de plantas contra microorganismos patógenos pulpares

**Introducción:** Durante el tratamiento de endodoncia el empleo de irrigantes es esencial. Actualmente se emplean sustancias (i.e. hipoclorito de sodio, clorhexidina) que si bien presentan características favorables destaca su alta toxicidad; por lo cual, la búsqueda de nuevas alternativas ha cobrado importancia.

**Objetivos:** Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra microorganismos patógenos pulpares; y el efecto citotóxico sobre fibroblastos gingivales humanos.

**Materiales y métodos:** Se seleccionaron como plantas de estudio *Leucophyllum frutescens* (cenizo), *Juglans mollis* (nogal), *Schinus molle L* (pirul) y *Heliopsis longipes* (chilcuaje). A partir de estos, se prepararon extractos por técnica de maceración en frío empleándose diclorometano-metanol realizándose 3 extracciones. Posteriormente, se realizaron pruebas químicas para la identificación parcial de sus principios activos y se evaluó la capacidad antimicrobiana mediante pruebas en sensidisco y pozo contra microorganismos patógenos pulpares: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococcus faecalis* y *Tanarella forsythia* (ATCC) comparándose con clorhexidina al 2% e hipoclorito de sodio al 5%. Se seleccionó el extracto que presentó mayor actividad antimicrobiana, se determinó la CMI por la técnica de pozo y su toxicidad sobre fibroblastos gingivales humanos por la técnica de FMCA, para luego diseñar una mezcla activa que incluyera el extracto y clorhexidina a un porcentaje menor.

**Resultados:** Todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana promedio desde ( $9.83 \pm 0.28$ ) a ( $18.33 \pm 1.52$ ) siendo el extracto de Pirul el que presentara halos de inhibición mayores. Se determinó que su CMI se encontraba entre las concentraciones de 1.5 y 0.75% para los microorganismos seleccionados. Se encontró también que el extracto de Pirul permite mayor viabilidad celular que los controles probados.

**Conclusiones:** En base al presente estudio, se resalta la capacidad antimicrobiana del extracto de Pirul contra microorganismos patógenos pulpares. Sugiere la posibilidad de ser empleado como sustancia antimicrobiana en el tratamiento de conductos radiculares.

**Director de Tesis:** PhD C. D. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

**Co-Director de Tesis** C. D. M.Sc. Jorge Jaime Flores Treviño

## ABSTRACT

**Name:** Jessica Patricia Arellano Barrientos

**Graduation date:** July 14th, 2016

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Odontología**

**Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia**

**Pages:**

**Study Title:** Antimicrobial and cytotoxic evaluation of plant extracts against pathogenic microorganisms in dental pulp.

**Introduction:** During endodontic irrigating employment is essential. Currently substances (i.e. sodium hypochlorite, chlorhexidine) they are used that have favorable characteristics but emphasizes its high toxicity; therefore, the search for new alternatives has become important.

**Objectives:** To evaluate the antimicrobial activity of plant extracts against pathogenic microorganisms pulp; and the cytotoxic effect on human gingival fibroblasts.

**Materials and Methods:** plants were selected as study *Leucophyllum frutescens* (pigweed), *Juglans mollis* (walnut), *Schinus molle L* (pepper tree) and *Heliopsis longipes* (chilcuaje). From these extracts by maceration techniques we were prepared cold dichloromethane-methanol being used performing 3 extractions. Subsequently, chemical tests for partial identification of active ingredients were made and the antimicrobial activity was evaluated by testing sensidisco and well against pulp pathogens: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococcus faecalis* and *Tanerella forsythia* (ATCC) comparing chlorhexidine 2 % and sodium hypochlorite 5%. The extract showed higher antimicrobial activity is selected, the MIC was determined by the technique well and their toxicity on human gingival fibroblasts by the technique of FMCA, then design an active mixture that includes the extract and chlorhexidine at a lower percentage.

**Results:** All extracts showed antimicrobial activity from average ( $9.83 \pm 0.28$ ) to ( $18.33 \pm 1.52$ ) being Pirul extract which present greater inhibition halos. It was determined that the MIC was among the concentrations of 1.5 and 0.75% for the selected microorganisms. It was also found that the extract Pirul allows greater cell viability controls tested.

**Conclusions:** Based on this study, the antimicrobial ability Pirul extract against pathogenic microorganisms pulp is highlighted. He suggests the possibility of being used as an antimicrobial substance in the treatment of root canals.

**Director de Tesis:** PhD C. D. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

**Co-Director de Tesis** C. D. M.Sc. Jorge Jaime Flores Treviño

## 1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos y sus productos son los principales agentes causales de los procesos patológicos que dañan la pulpa y la región periapical. Es por esto que uno de los objetivos más importantes del tratamiento de endodoncia es la eliminación de la infección bacteriana del sistema de conductos radiculares. Se han introducido numerosas medidas para reducir esta infección, entre las que se encuentran la instrumentación mecánica, irrigación y medicación intraconducto.

La irrigación, además de contribuir con la desinfección, es un coadyuvante en la eliminación del debris y la disolución del material orgánico. Se considera como irrigante ideal aquella sustancia que sea germicida y fungicida, que no sea irritante a los tejidos orales ni interfiera con la cicatrización de los mismos, debe ser estable en solución, así como poseer sustentividad y bajo costo. Actualmente, las sustancias más empleadas como irrigantes incluyen el hipoclorito de sodio y la clorhexidina.

El hipoclorito de sodio es recomendado como el principal irrigante debido a su amplio espectro antimicrobiano, así como por su capacidad única de disolución de materia orgánica; como irrigante es empleado en concentraciones que van del 0.5 al 5.25%. No obstante, presenta alta toxicidad reportándose daños graves a los tejidos circundantes proporcionales al volumen y concentración del irrigante extruido. Entre los daños que puede causar el hipoclorito de sodio se encuentra la necrosis del tejido periapical, equimosis, dolor intenso, inflamación, inyección al seno con irritación de la mucosa e incluso daño nervioso.

Por otra parte, la clorhexidina presenta gran actividad antibacteriana y antifúngica y, debido a su estructura catiónica, tiene como propiedad única la sustentividad por hasta semanas. Sin embargo, presenta ciertas desventajas como menor efectividad que el hipoclorito de sodio, inhabilidad de disolver material orgánico, reacciones alérgicas en un 2%, elevada toxicidad y alto costo.

Debido a la alta toxicidad de las sustancias usadas convencionalmente, en años recientes se ha incrementado el interés en los fitomedicamentos o medicamentos derivados de plantas. Entre las ventajas del uso de estas alternativas naturales se encuentran su disponibilidad, bajo costo con gran efectividad, baja toxicidad y la ausencia de resistencia antimicrobiana. En odontología, los fitomedicamentos han sido utilizados como antiinflamatorios, analgésicos y sedantes.

Actualmente, plantas como *Azadirachta indica*, *Zingiber Officinale* y *Pinus elliottii* han sido empleadas en endodoncia como irrigantes o medicamento intraconducto debido a su capacidad antimicrobiana.

En medicina la planta *Schinus molle L.*, conocido localmente como Pirul o árbol del Perú, ha sido empleado como antimicrobiano, antiséptico tópico, antioxidante, antiinflamatorio, agente antitumoral y antiespasmódico resaltando su efectividad y baja toxicidad. No obstante, no existen reportes donde haya sido utilizado en endodoncia, por lo que se plantea la posibilidad de evaluar su efecto antimicrobiano frente a microorganismos patógenos pulpares.

## 2. HIPÓTESIS

Hi= Los extractos de las plantas *Leucophyllum frutescens* (Cenizo), *Juglans mollis* (Nogal), *Schinus molle L* (Pirul) y *Heliopsis longipes* (Chilcuague) mostrarán actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos pulpares presentando baja toxicidad en fibroblastos gingivales humanos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra microorganismos patógenos pulpares; y el efecto citotóxico en fibroblastos gingivales humanos.

#### 3.2 Objetivo Específico

- Obtener los extractos diclorometano-metanólicos de las plantas *Schinus molle* (Pirul), *Leucophyllum frutescens* (Cenizo), *Juglans mollis* (Nogal) y *Heliopsis longipes*(Chilcuague) por técnica de maceración en frío.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de *Schinus molle* (Pirul), *Leucophyllum frutescens* (Cenizo), *Juglans mollis* (Nogal) y *Heliopsis longipes*(Chilcuague) contra *T. Forsythia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* y *E. faecalis* (ATCC) mediante técnica de difusión en agar.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria in vitro del extracto activo contra los principales microorganismos sensibles.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de una formulación que incorpore al extracto activo con el principal agente antimicrobiano.
- Determinar la citotoxicidad presentada por el extracto activo sobre fibroblastos gingivales humanos mediante la prueba de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico (FMCA).
- Realizar la identificación taxonómica de la planta activa.
- Caracterizar del extracto con mayor actividad por cromatografía de gases masas.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Pulpa dental y necrosis

La pulpa es el órgano que provee al diente de vitalidad mediante componentes vasculares y nerviosos, y mantiene su fisiología normal. También se encarga de la dentinogénesis, proceso dinámico que ocurre tanto en etapas de maduración como ante la reacción a injurias o estímulos, ya sean traumáticos o infecciosos como la caries (Bruno et al., 2010).

Este tejido puede resultar afectado por procesos como traumatismos y caries profundas, causando una inflamación llamada pulpitis o bien muerte pulpar o necrosis, esta última caracterizada por la descomposición séptica o aséptica del tejido pulpar que cursa con la destrucción del sistema microvascular y linfático de las células y, en última instancia, de las fibras nerviosas; producida por cualquier factor que dañe a la pulpa, siendo principalmente las bacterias gram negativas anaerobias estrictas los más asociados (López, 2004).

Las principales vías de entrada de los microorganismos a la cavidad pulpar comprenden principalmente túbulos dentinarios expuestos (i. e. caries), cavidad abierta (i.e. desalojo de material de obturación), conductos laterales en enfermedad periodontal, falta de restauración, entre otros (Lakshmi et al., 2010).

Puede presentarse asintomática, o bien, en ocasiones existen casos donde la infección se ha extendido al espacio del ligamento periodontal, mismas en el que el diente puede ser sintomático a la percusión o mostrar dolor espontáneo. Además pueden existir cambios

radiográficos, desde un engrosamiento del espacio del ligamento periodontal hasta observar el aspecto de una lesión radiolúcida periapical (Berman y Hartwell, 2011).

## **4.2 Infecciones pulpares y los principales microorganismos implicados**

En base a lo anterior podemos mencionar que la infección endodóntica se desarrolla en los conductos radiculares en ausencia de las defensas del huésped, como consecuencia de la necrosis de la pulpa o por la eliminación de la pulpa por tratamiento (Siqueira y Rocas, 2011)

Las infecciones endodónticas pueden clasificarse dependiendo de la localización en intrarradicular que se puede subdividir en primaria, cuando el conducto es infectado por primera vez; secundaria, cuando el microorganismo no estaba presente en la infección primaria pero es introducido durante el proceso endodóntico; o persistente, cuando resistieron a los procedimientos antimicrobianos (Siqueira y Rocas, 2011).

Recientes estudios han demostrado una colonización multiespecie visiblemente dominado por bacterias anaerobias. Entre los géneros bacterianos más comúnmente encontrados se encuentran *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Dialister*, *Streptococcus*, y *Treponema* (Siqueira y Rocas, 2013).

### **4.2.1 *Enterococcus faecalis***

Es una bacteria gram-positiva anaerobia facultativa (Kaptan et al. 2014) que puede presentarse como cocos aislados, en pares o incluso en cadenas. Su temperatura de crecimiento oscila entre 30-35°C (Herrera et al., 1998).

Dentro de los factores de virulencia encontrados en este género se encuentran la presencia de hemolisinas, sustancias de agregación, bacteriocinas, proteasas y aglutininas. Además, los carbohidratos de la pared celular o los sitios de unión de la fibronectina, que favorecen la adherencia a los tejidos del huésped, pueden incrementar la patogenicidad (Díaz et al., 2010).

Por otro lado, se ha reportado la resistencia de este microorganismo a diversos agentes antimicrobianos, ya que presenta el potencial de penetración en los túbulos dentinarios, capacidad de supervivencia prolongada en dientes con tratamientos endodónticos, capacidad de adhesión a la matriz colágena presente en la dentina y respuesta inadecuada a los antimicrobianos (Kaptan et al. 2014).

*Enterococcus faecalis* ha sido frecuentemente aislada en piezas que han recibido tratamiento endodóntico con infecciones persistentes (Halkai et al., 2014). Se ha aislado en infecciones endodónticas con desarrollo de periodontitis apical crónica, periodontitis apical aguda y abscesos apicales agudos con un porcentaje de aparición de 30, 10 y 5% respectivamente (Siqueira y Rocas, 2011).

#### **4.2.2 *Tanerella forsythia***

Es un bacilo gram negativo fuertemente asociado con periodontitis crónica. Forma parte del complejo rojo causante de las enfermedades periodontales y presenta sinergismo con *F. nucleatum* durante la formación de biopelículas y patogénesis (Rajendra et al., 2012).

Su virulencia está asociada a factores como tripsina, proteasas, sialidasas, actividad inductora de apoptosis, glucosidasa, glucosaminidasa, hemaglutinina, y componentes del estrato S bacteriano (Ashu, 2010).

Esta bacteria ha sido aislada a partir de piezas con periodontitis apical crónica, periodontitis apical aguda y abscesos apicales agudos con un porcentaje de aparición de 55, 65 y 70% respectivamente (Siqueira y Rocas, 2011).

#### **4.2.3 *Porphyromonas endodontalis***

Originalmente era conocido como *Bacteroides endodontalis* es un bacilo anaerobio Gram negativo (Lombardo et al., 2012) y se aísla preferentemente del surco gingival y conductos radiculares infectados (Castillo et al., 2002)

Esta especie presenta menor virulencia en relación a *Porphyromonas gingivalis*, destacando la presencia de factores como la cápsula, membrana externa y fimbrias (Castillo et al., 2002).

Esta especie se ha implicado en la etiología de los conductos radiculares infectados y la periodontitis (Lombardo et al., 2012). Se ha aislado en infecciones endodónticas con desarrollo de periodontitis apical crónica, periodontitis apical aguda y abscesos apicales agudos con un porcentaje de aparición de 60, 48 y 70% respectivamente (Siqueira y Rocas, 2011).

#### **4.2.4 *Porphyromonas gingivalis***

Bacteria gram negativa anaerobia estricta con alta presencia en biofilm subgingival. Morfológicamente es un bacilo corto que mide entre 0.5 mm-3.5 mm. Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa endotoxinas, no capsulados, no esporulados y sin flagelos (Ramos et al., 2011).

Este microorganismo expresa una serie de factores de virulencia causantes de importantes procesos patológicos orales de forma especial en el periodonto provocando

destrucción tisular (Castillo et al., 2002). Estos factores son fimbrias, enzimas proteolíticas, hemaglutininas, LPS y cápsula, y exhibe una diversidad genotípica y serotípica que permite una variabilidad intra-especie con la potencialidad de inducir inflamación (Díaz et al., 2012).

*Porphyromonas gingivalis* se aísla preferentemente del surco gingival; también en infecciones endodónticas con desarrollo de periodontitis apical crónica, periodontitis apical aguda y abscesos apicales agudos con un porcentaje de aparición de 30%,48% y 60% respectivamente (Siqueira y Rocas, 2011).

### **4.3 Tratamiento de endodoncia y uso de antimicrobianos**

El objetivo fundamental del tratamiento endodóntico consiste en la eliminación de los microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares; ya que estos gérmenes y sus productos derivados son considerados como la principal causa de la enfermedad pulpar y perirradicular (Mohammadi y Shalavi, 2013). Por tal razón, el uso de desbridamiento mecánico como la instrumentación rotatoria, irrigantes químicos (i.e. hipoclorito, clorhexidina) y medicamentos intraconductos como el hidróxido de calcio, son fundamentales (Rahimi et al., 2014).

Con el aumento en la tecnología ha sido posible identificar casos en los que las variaciones de la anatomía pulpar, la posición dentaria y las anormalidades de forma comprometen la correcta conformación mecánica de los conductos. Por lo que el uso de un irrigante apropiado es esencial durante el tratamiento de endodoncia (Mohammadi et al., 2014).

Dentro de las sustancias químicas propuestas como agentes irrigantes en endodoncia se encuentran el hipoclorito de sodio, clorhexidina, peróxido de hidrógeno, y solución salina

normal (Mohammadi et al., 2014). Sin embargo, se han reportado diversas alteraciones en relación al mal empleo de estas soluciones convencionales; así como desarrollo de resistencia y costo elevado de las mismas. Por lo cual hay una necesidad urgente de estrategias que sean capaces de inactivar patógenos del biofilm y que a su vez posean biocompatibilidad y menor potencial de desarrollar resistencia (Cieplik et al., 2014).

A continuación se presentan las características más sobresalientes de las dos soluciones de irrigación en endodoncia con más utilidad actualmente.

#### **4.3.1 Hipoclorito de sodio**

El hipoclorito de sodio es el irrigante de mayor uso durante el tratamiento endodóntico (Vera et al., 2012) y su historia data desde la primera guerra mundial cuando Henry Dakin empieza a utilizarla en una concentración de 0.5% para la desinfección de heridas para luego ser aceptado su uso en endodoncia a diferentes concentraciones (Gaspar et al., 2013).

Comercialmente se encuentra en concentraciones de 6 a 5.25%; tiene un pH alcalino entre 12 y 13, y es hipertónico (Vera et al., 2012). Entre sus propiedades se encuentra la capacidad bactericida, esporicida, fungicida y virucida (Jaju y Jaju, 2011); además de que disuelve el debris orgánico (Gaspar et al., 2013).

Sin embargo, se han reportado numerosos efectos adversos durante su empleo, entre los que encontramos lesiones en la piel, mucosa oral y los ojos, enfisema, reacciones alérgicas (Singh, 2010) y la inyección más allá del foramen pudiendo provocar daño al tejido óseo (Kerbl et al., 2010) y al tejido nervioso.

#### **4.3.2 Clorhexidina**

La clorhexidina ha sido ampliamente utilizada como irrigante endodóntico (Mohammadi et al., 2014). Fue descubierto durante una investigación sobre las propiedades biológicas polibiguanidas siendo seleccionada como la que presentaba mayor actividad antibacteriana y desde entonces es utilizada en el área de las ciencias médicas (Pomacóndor, 2010).

Se define como un compuesto químico sintético cargado positivamente, que interactúa con los fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana de la célula bacteriana dándole capacidad antimicrobiana de amplio espectro. En endodoncia, su modo de actividad antibacteriana se determina por su concentración que va desde 0,2% a 2% (Mohammadi et al., 2014).

Sin embargo, una de las principales desventajas de la clorhexidina como irrigante es que no posee capacidad de disolución de tejido, además de que produce la formación de un precipitado de color café anaranjado altamente tóxico conocido como para-cloro-anilina (PCA) cuando se combina con hipoclorito de sodio o cuando permanece en el conducto por periodos de 14 días o más (Vera et al., 2012). Esto, aunado con el elevado precio, ha hecho que su uso en endodoncia haya disminuido.

#### **4.4 Fitoterapia en odontología**

Las plantas elaboran y almacenan productos propios durante el crecimiento debido al metabolismo. Se denomina planta medicinal a cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Cañigüeral et al., 2003).

Los principios activos son los que definen y ayudan a clasificar las plantas, le dan sus propiedades y usos terapéuticos. Entre los principios activos se encuentran heterósidos, alcaloides, aceites esenciales, esencias, taninos, entre otros (Pamplona, 2008), responsables

de los efectos biológicos que pueden presentar los extractos de plantas como actividad antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatorio, coagulante, analgésico, entre otro.

De manera general, en el tratamiento de las afecciones bucales se emplean medidas profilácticas, medicación o la combinación de ambas; empleando como tratamiento fitofármacos como terapia única o combinada con otros fármacos. Recientemente en el tratamiento de afecciones orales la incorporación de plantas se limita a un pequeño grupo de preparados para tratar los padecimientos bucofaríngeos, sin explotar las potencialidades de un número mayor de extractos, lo que ha convertido la terapia con plantas, algunas veces, en empírica (Moreno et al., 2011).

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también la relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevos compuestos que en algunos casos tiene un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos (Avello y Cisternas, 2010).

#### **4.4.1 *Schinus molle***

Pertenece a la familia Anacardiaceae de ocurrencia pantropical que comprende alrededor de 70 géneros y 600 especies (Mendonça et al., 2012).

*Schinus molle* L., localmente conocida como Pirúl, árbol del Perú o falso pimentero, es una especie arbórea dioica nativa de Sudamérica (Ramírez y Badano, 2013), de rápido crecimiento cuya altura se encuentra entre los 4 y 8 metros, y su diámetro entre los 25 a 35 cm (CONAFOR, 2014)

Se ha reportado para esta planta actividad antibacteriana (Gualtieri et al., 2012), cicatrizante (Orozco, 2013) y ha sido empleada en el tratamiento estomacal y agente antidiarreico debido a la presencia de taninos, grupo químico que le brinda sus propiedades

(Mendonça et al., 2012). Además se le atribuyen efectos analgésicos, fungicidas y antiinflamatorios (Luna, 2012)

Así mismo presenta flavonoides, a los que también se les atribuyen sus propiedades terapéuticas (Orozco, 2013).

#### **4.4.2 *Leucophyllum frutescens***

*Leucophyllum frutescens* pertenece al género *Leucophyllum*, el cual comprende 14 especies distribuidos principalmente en México (LaCourse y Bert., 1997). Es conocido comúnmente como cenizo, hoja de plata de Texas, Texas Ranger, Texas salvia y salvia púrpura debido al color de sus flores y el aspecto ceniciento de sus hojas (Gándara y Sosa, 2013).

Se ha descrito su actividad antimicobacteriana (Alanís et al. 2012) (Molina et al., 2007), actualmente no se encuentra en la literatura los compuestos activos responsables de su efecto terapéuticos.

#### **4.4.3 *Heliopsis longipes***

*Heliopsis longipes*, también conocida con el nombre náhuatl de “chilcuague” y “chilmecatl”, es una planta empleada como especia, insecticida y planta medicinal en el centro de América (Molina et al., 1996).

Entre sus efectos se describen propiedades bacteriostáticas, fungicidas y anestésicas bucales de sus raíces (Molina et al., 2004).

Estas propiedades terapéuticas están relacionada con la presencia de afinina, la cual es la amina más presente representando el 0.78% del peso en seco de la planta (Molina et al., 1996). Se ha reportado el uso de extracto derivado de las raíces de esta planta para el

tratamiento de resfriados y neumonías, como anestésico en extracciones dentales (Molina et al., 1999).

#### **4.4.4 *Juglans mollis***

También conocida como nogal de castila, nuez de castilla, nuez persa y nuez criolla, pertenece a la familia Jugladaceae (Rodríguez, 2011).

Es un nogal silvestre que crece en áreas cercanas a ríos y arroyos, alcanza a medir hasta 18 m. de altura. Presenta hojas compuestas de 5 a 9 hojuelas afelpadas, así como nueces no comestibles de 3 a 4 cm. con forma, color y tamaño parecidos a un limón. Se localiza en Nuevo León y en el Norte de San Luis Potosí (Martínez, 1979).

Entre sus efectos terapéuticos reconocidos destaca la actividad antituberculosa (Cruz et al., 2008); y, dependiendo del extracto, este efecto puede deberse a sustancias como triterpenos, sesquiterpenlactonas, quinonas, alcaloides y esteroides (Salinas, 2004).

#### **4.5 Obtención de extractos**

Los compuestos activos son sustancias, generalmente producidas como metabolitos secundarios de las plantas, que pueden provocar efectos farmacológicos en humanos y animales (Azmir et al., 2013).

Diversas técnicas de extracción se pueden aplicar para la obtención de compuestos bioactivos. Las técnicas clásicas se basan en la elección del disolvente junto con el uso de agitación y/o calor. Las técnicas tradicionales existentes son: extracción Soxhlet y maceración (Ruiz et al., 2014).

La maceración es una extracción sólido-líquido en el que el compuesto bioactivo (soluto) que se encuentra en el interior del material vegetal se extrae por remojo en un

disolvente específico por un período de tiempo. Su eficacia dependerá de dos factores principales: solubilidad, empleando soluciones de misma polaridad que el compuesto; y difusión eficaz, determinada por la tasa de transferencia de masa del soluto a partir del material vegetal al disolvente (Choon et al., 2014).

El extractor Soxhlet fue propuesto por primera vez por el químico alemán Franz Ritter von Soxhlet en 1879. En este una pequeña cantidad de muestra seca se coloca en un dedal, después éste se coloca en el matraz de destilación que contiene el disolvente seleccionado y después de llegar a un nivel de desbordamiento, la solución del dedal es aspirado por un sifón. Posteriormente el sifón descarga la solución de nuevo en el matraz de destilación (Azmir et al., 2013).

#### **4.6 Citotoxicidad**

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Se han desarrollado distintas pruebas in vitro para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales animales, cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas (Fentem, 1994).

Actualmente y bajo el principio de “Las 3 R’s” (reemplazar, reducir y refinamiento del uso animal), existe un continuo esfuerzo de encontrar alternativas que eviten o disminuyan las pruebas en animales (Adler et al., 2010).

El ensayo de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico (FMCA) es una prueba de viabilidad celular utilizado para la medición del efecto citotóxico y/o citostático de diferentes compuestos in vitro. El ensayo se basa en la hidrólisis de la molécula prueba,

diacetato de fluoresceína (FDA), por esterasas en las células con membranas plasmáticas intactas (Lindhagen et al., 2008).

Esta prueba ha sido empleada para la evaluación de la toxicidad celular en pruebas de sensibilidad farmacológica, usándose diversas metodologías (Csóka et al., 1997).

## 5. MARCO DE REFERENCIA

Los irrigantes intraconducto aumentan la eliminación bacteriana y facilitan la remoción de tejido necrótico y partículas de dentina del conducto radicular; siendo utilizadas diferentes sustancias a través del tiempo (Vera et al., 2012). Entre los irrigantes más empleados se encuentra el hipoclorito de sodio y la clorhexidina.

Se ha reportado que el hipoclorito de sodio fue introducido durante la primera guerra mundial por Darkin, empleándose para la desinfección de heridas abiertas. Fue hasta 1917 cuando Barret difundió su uso dentro de conductos radiculares (Cárdenas et al., 2012). La clorhexidina, en cambio, ha sido empleada por muchos años en la práctica odontológica principalmente como desinfectante en los tejidos periodontales. Basado en este principio, su uso se extendió al conducto radicular (Vera et al., 2012).

Se ha evaluado la eficacia antimicrobiana de los agentes más utilizados en endodoncia sobre el biofilm de una pulpa necrótica. Esto fue reportado en “An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates” donde se aisló un biofilm a partir de pulpa infectada y se identificó *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* and *Enterococcus faecalis*. Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de 4 agentes irrigantes (hipoclorito de sodio, gluconato de clorhexidina, yodo povidona y 5 ppm de plata coloidal) (Spratt et al., 2001).

Sin embargo, según lo publicado por Del Castillo Ugedo et al. en el 2011, las lesiones causadas por hipoclorito tienen una escala de gravedad variable, encontrándose desde lesiones oculares por contacto directo, hasta cuadros muy aparatosos por inyección del

hipoclorito sódico más allá del ápice causando inflamación firme desde el ojo hasta el borde de la mandíbula y afectación de la sensibilidad (Del Castillo et al., 2011)

Así mismo, se han descrito alteraciones causadas por la clorhexidina como la aparición de resistencia bacteriana y alteraciones del color dental. Además, Baquerizo describe la formación de un precipitado llamado paracloroanilina cuando la clorhexidina entra en contacto con el hipoclorito de sodio. Este compuesto es citotóxico y compromete el sellado de la obturación apical al cerrar los túbulos dentinarios (Baquerizo, 2014)

La fitoterapia implica el uso de plantas y sus productos en el tratamiento de la enfermedad directamente o indirectamente. Los productos naturales derivados de plantas medicinales han demostrado ser una fuente de compuestos biológicamente activos, los cuales han sido la base para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos (Hotwani, 2014)

Según la investigación realizada por Vieira et al. en el 2014, un 55.7% de la población de Sao Luis, Brasil; reporta el uso de plantas con fines terapéuticos (Vieira et al., 2014). Dentro de la abundancia florística de México, plantas con propiedades terapéuticas son excepcionales debido a su popularidad en el manejo de varias enfermedades (Zamora y Nieto, 1992).

La capacidad terapéuticas de algunas plantas se debe a la presencia de metabolitos activos dentro de su composición. Un método para la identificación de estas sustancias es la técnica de cromatografía en capa fina. En la tesis titulada “Aislamiento y caracterización de compuestos derivados de plantas de la familia Juglandaceae con efecto antimicrobiano sobre *Mycobacterium tuberculosis*” en el 2011, se empleó dicha técnica colocando una pequeña muestra del extracto sobre cromatoplasmas para su posterior revelado con bromuro de cobalto y visualización con luz UV.

Otro método para identificación y aislamiento de principios activos es la utilización de cromatografía en gases y espectrometría en masas, donde se emplea un cromatógrafo donde se inyecta el extracto a estudiar con un gas portador y se evalúa la presencia de compuestos por espectrometría, como lo indica Mangas et al. en el 2008.

En cuanto a la capacidad antimicrobiana, esta puede ser evaluada de diferentes maneras; siendo una de las más comunes la difusión en agar. En este, luego de sembrar el microorganismo problema, se crean pozos de 5 mm sobre el agar para la posterior inoculación del extracto; evaluándose la presencia de halos de inhibición después de la incubación. Esto fue realizado en el estudio “In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action” del 2012, donde se comprobó la capacidad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de la planta *Aroeria-da-praia* frente *Enterococcus faecalis*, mostrando mayor efecto antimicrobiano que hipoclorito de sodio al 2.5% (Melo et al. 2012).

Además, en el estudio presentado por Castilho et al. en el 2013, se reportaron seis extractos biológicamente activos frente a *E. faecalis*, siendo mejor la inhibición reportada por estas en comparación con la Clorhexidina (Castillo et al., 2013).

Gentill et al., en el 2006 analizaron la capacidad antimicrobiana de una fracción de acetato de etilo extraído de *Arctium lappa* frente a una suspensión bacteriana basada en *P. Aeruginosa*, *E. coli*, *Lactobacillus acidophilus* y *S. mutans*. Este fue comparado contra hidróxido de calcio, inhibiéndose el crecimiento de las bacterias estudiadas (Gentil et al., 2006)

También Costa et al., en el 2012 evaluaron la capacidad antimicrobiana de aroeira da Praia y quixabeira sobre *E. faecalis*; observándose la inhibición de esta bacteria en 21

dientes unirradiculares mediante microscopia electrónica, tomándose como control positivo hipoclorito de sodio al 2.5% y clorhexidina al 0.12% (Costa et al., 2012).

En cuanto a las pruebas de citotoxicidad, en el estudio publicado por Laredo et al., en el 2016 se empleó la prueba de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico, el cual se ha reportado con utilidad en el estudio de nuevas sustancias terapéuticas.

## 6. MÉTODOS



FIG.1 Hojas de Pirul



FIG.2 Hojas de Cenizo



FIG.3 Corteza de nogal



FIG4. Raíz de Chilcuague



FIG5. Planta molida

### 6.1 Obtención de las plantas de estudio

Las plantas de estudio fueron compradas a un proveedor reconocido de viveros importantes de la ciudad. Se adquirieron 600 g en estado fresco de *Leucophyllum frutescens* (cenizo), *Juglans mollis* (nogal), *Schinus molle L* (pirul) y 600g en estado seco de *Heliopsis longipes* (Chilcuague); los cuales habían sido recolectados en la región sur del estado de Nuevo León en el mes de febrero de 2015.

Las plantas se lavaron con agua corriente y, posteriormente, se separaron de acuerdo a los elementos que comprendían la muestra: hojas de *S. molle L*, hojas de *L. frutescens*, corteza de *J. mollis*, corteza de *H. longipes*. El material recolectado se dejó secar a temperatura ambiente en la sombra por 5 días.

### 6.2 Preparación de los extractos

De cada muestra se preparó un extracto empleándose como solventes una mezcla con proporción 1:1 de diclorometano metanol por la técnica de maceración en frío.



FIG6. Pesaje de la planta



FIG7. Se colocó planta en contacto con solvente

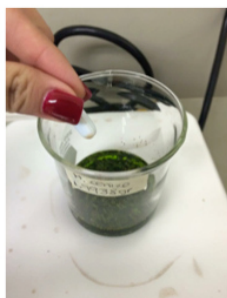


FIG8. Colocación de barra magnética



FIG9. 24 hrs en placa de agitación sin calor



FIG10. Rotoevaporador

Para lo cual, cada muestra se maceró por separado empleándose una licuadora eléctrica. Después, en el laboratorio de Biología Molecular, se pesaron 20 g de hojas de *S. molle*, 20 g de *H. Longipes*, 20 g de *J. Mollis*, y 2 g de hojas de *L. frutescens* utilizándose báscula analítica.

Posteriormente, cada muestra fue colocada en un vaso de precipitado estéril previamente marcado, al cual se le agregaron 100 mL de metanol y 100 mL de diclorometano en el caso de las muestras de corteza de *J. mollis*, hojas de *S. molle* y corteza de *H. longipes*; y 25 mL de metanol y 25 mL de diclorometano para la muestra de hojas de *L. frutescens*.

A cada infusión se le agregó también una barra magnética y se colocaron en la plancha de calentamiento en frío en agitación constante por 24 horas. Posteriormente se filtraron con papel filtro y se colocaron en un frasco de vidrio estéril, tapados y en refrigeración para su posterior uso.

La extracción fue repetida a las 47 y 72 horas siguiendo el mismo procedimiento.

Posteriormente, en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas unidad B, los extractos diarios de la misma planta fueron concentrados y llevados al rotoevaporador para eliminar restos de solventes a 100°C durante 20 minutos.

El extracto final se colocó en un frasco estéril previamente pesado, se tapó con aluminio y se dejó a temperatura ambiente para producir la evaporación final del solvente restante.



FIG11. Ajuste de matraz

Este procedimiento de rotoevaporación se realizó con cada muestra, posteriormente los frascos que contenían los extractos finales se almacenaron en un ambiente fresco y libre de humedad.

Debido a que el solvente de las extracciones diarias de la muestra obtenida a partir de hojas de *L. frutescens* se evaporó antes de la

rotoevaporación, se decidió que este proceso no se llevara a cabo con dichos extractos, por lo que se evaluaron los extractos diarios por separado.

### 6.3 Pruebas de solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad a los extractos finales con el fin de determinar el vehículo compatible. Se realizaron diluciones partiendo de 2mg de cada extracto empleando: etanol en concentraciones de 100, 50, 20 y 10%, agua y DMCO al 10%.

Se vortexearon para producir la homogeneidad de la mezcla y evaluar el nivel de solubilidad de acuerdo a los siguientes criterios: + baja o nula solubilidad, ++ mediana solubilidad, +++ alta solubilidad. Los resultados obtenidos fueron vaciados en el apéndice A.

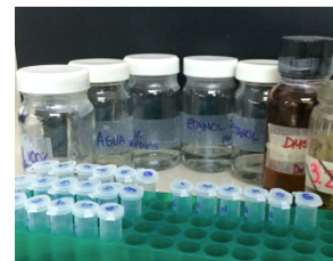


FIG12. Material usado para prueba de solubilidad

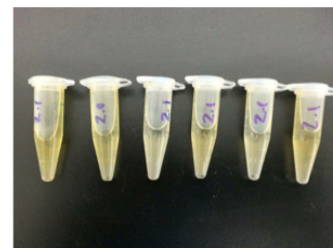


FIG13. Observación de prueba de solubilidad

## 6.4 Determinación de la actividad de los extractos contra los microorganismos prueba

### 6.4.1 Microorganismo de prueba



FIG14. Medios de cultivo Müller Hinton en caldo y agar

Los microorganismos prueba fueron los siguientes: *Porphyromonas gingivalis*, ATCC 53978; *Porphyromonas endodontalis*, ATCC 35406, *Enterococcus faecalis*, ATCC 11420, *Tanarella forsythia*, ATCC 43037; los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Odontología, UANL.

Se inocularon 100  $\mu$ L de cada microorganismo en tubos de ensayo previamente etiquetados que contenían 10 mL de medio Mueller Hinton estéril. Posteriormente, fueron cultivados a 37°C por 2 días bajo condiciones anaerobias.

#### 6.4.2 Preparación de diluciones

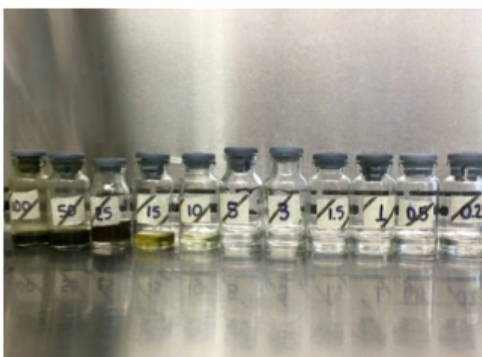


FIG15. Diluciones del extracto de Pirul.

Se pesaron 100 mg de cada extracto y se realizaron tres diluciones de cada extracto de planta, para lo cual primero se pesaron 100 mg del extracto de cada planta y se colocó individualmente en tubos ependorf estériles previamente marcados. Para la primera dilución

se agregó a la muestra pesada 1ml de etanol al 100% y se vibró en el vortex para producir homogeneidad.

Una vez homogénea, se tomaron 500 $\mu$ l de la dilución 1 y 500 $\mu$ l de etanol al 100% para producir la dilución 2. Luego de mezclarse en el vórtex, se repitió el procedimiento para obtener la dilución 3.

Para homogeneizar valores, se entiende entonces que la primera dilución correspondería a una concentración de la planta del 10%, la segunda al 5% y la tercer dilución al 2.5%, lo cual podría ser comparable con los controles.

Como controles positivos, se tomó 1 ml de hipoclorito al 5.25% y 1 ml de clorhexidina al 2%. Como control negativo se empleó etanol 100% que fue usado como vehículo también en los extractos.

#### 6.4.3 Prueba antimicrobiana preliminar mediante sensidisco

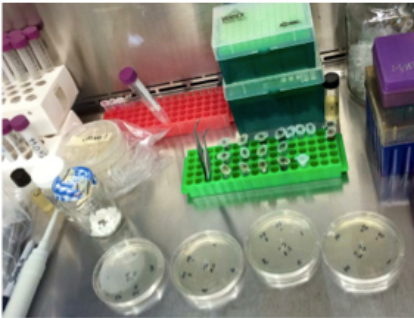


FIG16. Material empleado para prueba antimicrobiana en sensidisco

La prueba antimicrobiana en sensidisco fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UANL. Se preparó el campo de trabajo en la campana de flujo laminar, limpiándose con etanol y dejándose bajo luz UV por 15 min para producir un ambiente de esterilidad; después se introdujo el material de trabajo.

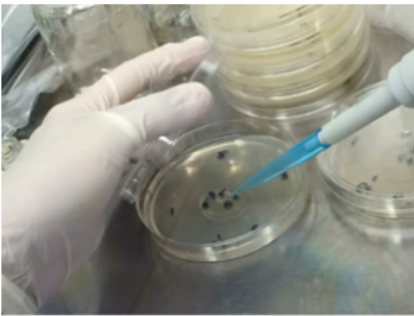


FIG17. Siembra del microorganismo problema

Se etiquetaron 16 cajas de Petri preparadas con agar Müeller Hinton, las cuales fueron divididas de la siguiente manera: cuatro cajas por cada microorganismo de estudio, probándose en cada una un extracto diferente.

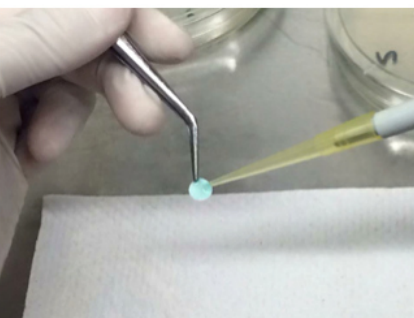


FIG18. Sensidisco impregnado con el extracto problema

Primeramente, se sembraron 100µl de la bacteria en cada caja y se extendió con un isopo estéril mediante agotamiento por estría. Con pinzas de curación estériles se tomaba un sensidisco y se impregnaba con 10µl de la primer dilución y se colocaba en el sitio marcado en

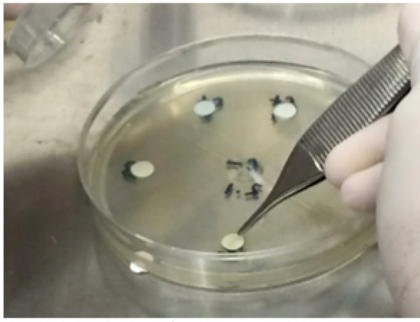


FIG19. Colocación de sensibilizadores en caja de Petri marcada anteriormente

la caja de petri siguiendo el orden de acuerdo con las manecillas del reloj. Cada dilución fue colocada de la misma manera, así mismo con los controles positivos y negativo. El proceso fue el mismo en cada caja.

Las cajas fueron colocadas en bolsas de plástico a las que se le agregó la atmósfera anaerobia y se cerraron evitando la entrada de oxígeno con cinta adhesiva. Se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la aparición de halos de inhibición los cuales fueron medidos con vernier a las 24 y 48 horas, recolectándose los datos en tablas, mismas que pueden observarse en los apéndices B, C, D, E, F, G, H e I.

#### **6.4.4 Prueba antimicrobiana en pozo**

Luego de obtenerse los resultados de la prueba antimicrobiana en sensibilizador, se determinó que los extractos que mostraban mayor actividad antimicrobiana eran los obtenidos a partir de hojas de *L. frutescens* y hojas de *S. molle*; por lo cual, dichos extractos fueron evaluados nuevamente para observar su comportamiento mediante prueba en pozo. La prueba antimicrobiana en pozo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UANL.

Se prepararon 10 cajas de petri que contenían agar Müller-Hinton, las cuales fueron distribuidas de la siguiente manera: cuatro cajas para el extracto de *S. molle* de las cuales dos se sembraron con *P. gingivalis* y dos con *E. faecalis*; cuatro cajas para el extracto de *L. frutescens* de las cuales dos se sembraron con *P. gingivalis* y dos con *E. faecalis*; y dos cajas en las que se colocaron los controles positivos y negativos, sembrándose en una *E. faecalis* y en otra *P. Gingivalis*. Los microorganismos de estudio fueron resembrados y

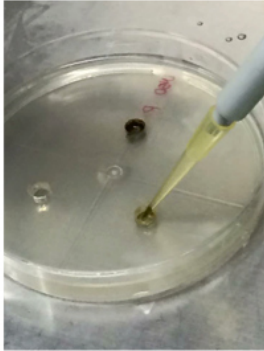


FIG20. Inoculación del extracto en el pozo

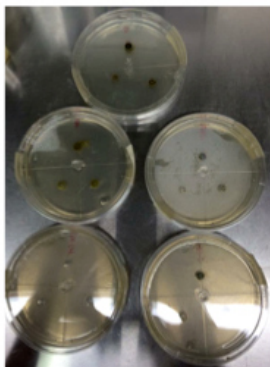


FIG21. Cajas de Petri luego del procedimiento

colocados en la incubadora por 3 días, también se prepararon nuevamente las diluciones de los extractos más activos.

Una vez contando con lo necesario, la campana de flujo laminar fue esterilizada mediante luz UV por 15 min para posteriormente introducir el material de trabajo.

Las cajas de Petri fueron señaladas y sembradas con 100 $\mu$ l de las especies tal cual se describió anteriormente. Después, utilizándose una pipeta pasteur estéril de cristal, se diseñaron tres pozos en de 7 mm en cada caja, retirándose el agar sobrante con una cucharilla de dentina estéril. En los pozos confeccionados se agregaron 30 $\mu$ l de las diluciones uno, dos y tres siguiendo el orden de las manecillas del reloj. En las cajas destinadas a la evaluación de los controles, se agregaron a los pozos 30 $\mu$ l de Hipoclorito al 5.25%, Clorhexidina al 2% y Etanol al 100% siguiendo este orden con las manecillas del reloj.

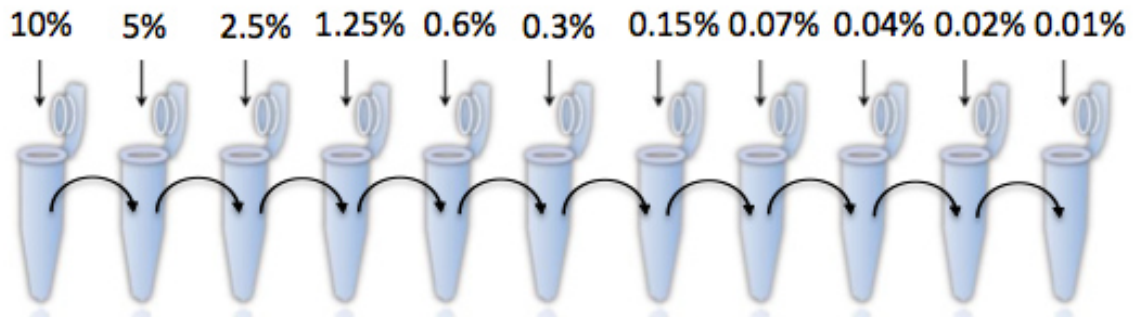
Una vez terminado el procedimiento, las cajas fueron almacenadas en bolsas de plástico y atmósfera anaerobia, incubándose a 37°C durante 96 horas. Los resultados fueron visualizados a las 24, 48 y 96 horas, y los datos obtenidos se recolectaron en los apéndices J, K, L y M.

#### **6.4.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

##### **6.4.5.1 Preparación de las diluciones de los extractos activos**

Se prepararon 10 diluciones a partir de la concentración inicial que constaba de 100 mg de extracto y 1 ml de etanol al 10%, las cuales correspondían a los siguientes porcentajes de concentración del extracto en relación al solvente: 5%, 2.5%, 1.25%, 0.6%, 0.3%, 0.15%,

0.07%, 0.04%, 0.02%, 0.01%, etiquetándose cada tubo con la numeración correspondiente del 1 al 10, señalándose con el 1 la de mayor concentración y con el 10 la de menor.



#### 6.4.5.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por difusión en agar en pozo

Para realizar este procedimiento, se resembraron las cepas de *P. gingivalis* y *E. faecalis* en medio líquido Müeller Hinton en condiciones anaeróbicas.

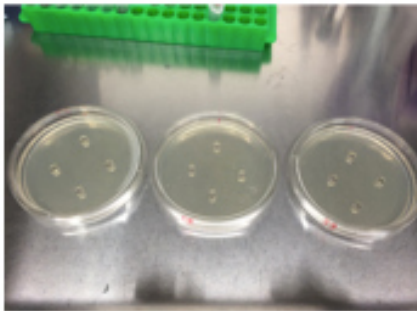


FIG22. Confección de los pozos de 7 mm de diámetro.

Se prepararon cajas de Petri con medio Müeller Hinton, las cuales fueron señaladas y sembradas con 100µl de las especies mencionadas anteriormente.

Después, utilizándose una pipeta pasteur estéril de cristal, se diseñaron cuatro pozos en de 7 mm en cada caja, retirándose el agar sobrante con una cucharilla de dentina estéril. En los pozos confeccionados se agregaron 30µl de las diluciones uno,

dos, tres y cuatro siguiendo el orden de las manecillas del reloj y realizándose triplicado.

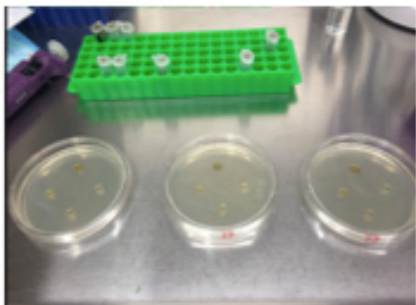


FIG23. Triplicado luego de la inoculación de las diluciones prueba.

La misma metodología fue empleada para diseñar nuevas cajas en las que se probaron las diluciones uno,

cinco, seis, siete,; repitiéndose también para las diluciones uno, ocho, nueve y diez.

Los resultados fueron observados a las 24 y 48 horas, midiéndose los halos de inhibición con un vernier sobre la luz de un negatoscopio. Los resultados obtenidos se pueden observar en los apéndices N y Ñ.

#### **6.4.5.3 Evaluación antimicrobiana de la formulación con extracto activo y el principal agente antimicrobiano.**

Se realizaron diluciones del extracto diclorometano-metanol de hojas de *S. molle* al 2%, 4%, 6% y 8% de concentración, correspondientes a 20mg, 40mg, 60mg y 80mg sobre 1 ml de etanol al 100% respectivamente. Al mismo tiempo, se realizaron diluciones de clorhexidina correspondientes al 2%, 1% y 0.5%.

Se sembraron 6 cajas con 100µl de *E. faecalis* y seis cajas con 100µl de *P. gingivalis*, extendiéndose el inóculo con un isópo estéril. Una vez sembradas, se elaboraron 4 pozos de 7 mm de diámetro en cada caja y se dividieron en 4 grupos de 3 cajas.

En el primer grupo, y sobre la siembra de *E. faecalis*, se inocularon 20 µl de extracto de pirul al 2% en un pozo, frente a este, se inoculó la misma cantidad del control positivo (Clorhexidina al 2%). En el pozo superior se inocularon 30 µl de una mezcla 1:1 de extracto al 2% + clorhexidina al 1%; mientras que en el pozo inferior se inoculó la misma

cantidad de una mezcla 1:1 de extracto de pirul al 4% + clorhexidina al 1%.

En el segundo grupo en contacto con *E. faecalis*, se inocularon 20µl de extracto de pirul al 2% en un pozo y Clorhexidina al 2% en el pozo contrario. Posteriormente,

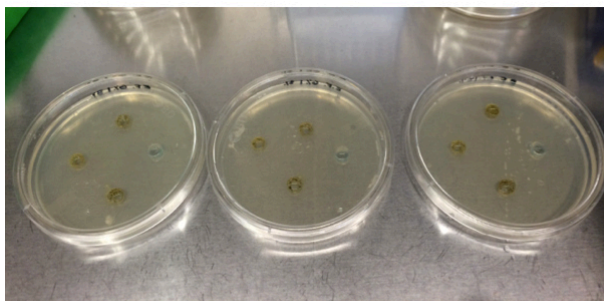


FIG24. Triplicado luego de la inoculación de los controles y las mezclas activas

se inoculó en el pozo superior 30 µl de la mezcla 1:1 de extracto de *S. molle* al 6% + clorhexidina al 0.5%; y en el pozo inferior 30 µl de la mezcla 1:1 de extracto de *S. molle* al 8% + clorhexidina al 0.5%.

En el tercer y cuarto grupo, correspondientes a la siembra de *P. gingivalis*, se inocularon las diluciones problema de la misma manera en que se realizó en los grupos 1 y 2.

Los resultados fueron observados a las 24 horas, midiéndose los halos de inhibición con un vernier sobre la luz de un negatoscopio. Los resultados pueden observarse en los apéndices O y P.

## 6.5 Evaluación de citotoxicidad

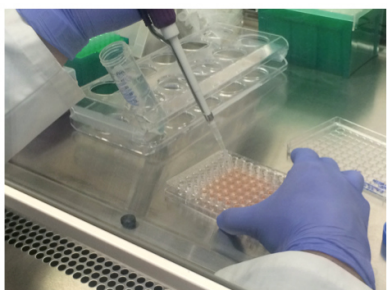


FIG25. Evaluación de la citotoxicidad de *S. Molle* por técnica FMCA

Se evaluó la citotoxicidad del extracto de *Schinus molle* mediante la técnica FMCA para analizar la viabilidad celular a los 30, 60 y 120 min de exposición y se compararon los resultados obtenidos con los controles clorhexidina e hipoclorito de sodio; siguiendo la

metodología previamente utilizada por Larsson y Nygren en 1989.

Para dicho ensayo se empleó fibroblastos gingivales humanos, los cuales fueron cultivados en medio Eagle  $\alpha$ - modificado ( $\alpha$ -MEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, 2mL L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B a 37° en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el ensayo y después de obtener la confluencia celular necesaria, se colocaron 18 000 células por pozo en una caja de 96 pozos y se dejó incubar por 24 horas. Posteriormente, se adicionó el extracto de Pirul evaluándose la concentración efectiva (6.25%) comparándose

con los controles positivos NaOCl al 0.525% y CHX al 0.2%, así como con el control negativo Etanol. El medio se removió dependiendo del tiempo de estudio (120, 60 y 30 min) para posteriormente lavar las células tres veces con PBS.

Previo al estudio, la molécula diacetato de fluoresceína (FDA) se disolvió en DMSO y se mantuvo a -20°C a una concentración de 10 µg/mL. El FDA se diluyó en PBS a µg/ml y posteriormente, 200 µL de esta mezcla fue adicionada a cada pozo. La placa fue incubada durante 30 min a 37°C en oscuridad, para después escanearse por el fluorómetro GloMax Multi+Microplate Multimode a 495 nm.

## **6.6 Análisis fitoquímico**

### **6.6.1 Identificación taxonómica del principal extracto activo.**

Una muestra pequeña de *Schinus molle* fue puesta a sequedad a temperatura ambiente bajo la sombra por 10 días y fue depositada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su identificación taxonómica.

### **6.6.2 Caracterización del extracto con mayor actividad por cromatografía de gasas masas**

Una solución correspondiente a 10mg del extracto de *Schinus molle* en contacto con 10 mL de cloroformo fue llevada al departamento de Servicios Profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL para su análisis mediante espectrometría de gases acoplada a masas con el fin de determinar los principales componentes encontrados en el extracto.

## 7. RESULTADOS

### 1. Obtención de extractos e identificación taxonómica del material vegetal activo.

Se elaboraron cuatro extractos diclorometano-metanol a partir de 200 g de cada planta de estudio: *Schinus molle*, *Leucophyllum frutescens*, *Juglans mollis* y *Heliopsis longipes*, las cuales presentaron un rendimiento de 4.73, 0.19, 1.25 y 0.48 g respectivamente. Se realizó la identificación taxonómica de la planta que presentó mayor actividad por parte del Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas Unidad A de la UANL, donde se confirmó que correspondía a *Schinus molle* o “Pirul” proporcionándose el número de voucher 027834 para la muestra analizada.

Posteriormente se determinó que el principal vehículo que favoreció la solubilidad para todos los extractos fue Etanol al 100% (Ver tabla 1).

Plantas	Etanol 100%	Etanol 50%	Etanol 20%	Etanol 10%	DMSO	Agua
<i>Schinus molle</i>	+++	+	+	+	+	+
<i>Leucophyllum frutescens</i>	+++	++	++	++	+++	++
<i>Juglans mollis</i>	++	+	+	+	+	+
<i>Heliopsis longipes</i>	++	++	++	++	+++	++

Solubilidad= muy soluble +++, medianamente soluble ++, poco soluble+, insoluble - (n=3)

2. Evaluar la actividad antimicrobiana de *Schinus molle* (Pirul), *Leucophyllum frutescens* (Cenizo), *Juglans mollis* (Nogal) y *Heliopsis longipes*(Chilcuague) contra *T. Forsythia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* y *E. faecalis* (ATCC) mediante técnica de difusión en agar.

## 2.1 Screening bacteriológico mediante difusión en agar en disco

En el ensayo preeliminar se determinó que todos los extractos probados fueron activos contra todos los microorganismos estudio en las tres concentraciones probadas, mostrando mayor actividad los extractos obtenidos a partir de *Schinus molle* y *Leucophyllum frutescens*.

Plantas	<i>T. forsythia</i>		<i>P. endodontalis</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>Schinus molle</i>	14±1	14±1	SL	SL	11±0.5	12±1	11±1.4	13.5±0.5
<i>Leucophyllum frutescens</i>	11.5±2	6.5±0.5	7.5±0.5	7±0.5	7.4±1	7.5±1	14.5±0.5	15±1.2
<i>Juglans mollis</i>	8±0.5	7±.05	SL	SL	7±1	8±0.5	9±1	10±1
<i>Heliopsis longipes</i>	8±1.1	9±1	9±.05	8±1	8±.8	9±1	9±1	10±1
Clorhexidina	9±1	10±1	9±1	7±1.1	7±0.4	20±4	18±3	24±2
Hipoclorito de Sodio	24±0.5	27±2	30±1	31±1	29±2	29±2	24±3	29±3

n=3

La concentración al 10 % de cada planta fue evaluada a las 24 y 48 horas, obteniéndose que para *P. gingivalis* el extracto que mostró mayor actividad fue el obtenido de *Schinus molle*, presentando halos de 11±0.5 y 12±1 mm a las 24 y 48 hrs, respectivamente; seguido por el extracto de *Leucophyllum frutescens* con halos de 7.4±1 y 7.5±1 mm. El extracto que mostró menor actividad fue el de *Juglans mollis*, que presento halos con medidas de 7±1 y 8±0.5 mm en las medidas de tiempo descritas. Estas medidas fueron comparados con los controles CHX que alcanzó medias de 20±4 mm y NaOCl con medidas de hasta 29±2 mm. Para *E. faecalis*, el extracto que mostró mayor actividad fue el elaborado a partir de *L. frutescens* con halos de 14.5 y 15mm a las 24 y 48 horas respectivamente, seguido por el extracto de *S. molle* con medidas de 11±1.4 y 13.5±0.5 mm; mientras que los extractos a partir de *J. mollis* y *H. longipes* se comportaron de la misma manera con halos de 9±1 y 10±1 mm. Estos se compararon con los controles que presentaron halos de entre 24 y 29 mm. Por otra parte, la concentración del 10% del extracto de *S. molle* fue el que presentó mayor actividad sobre *T. forsythia*, mostrando halos inhibitorios de 14±1 mm a ambas

medidas de tiempo, seguido por el extracto de *L. frutescens* con halos de  $11.5 \pm 2$  y  $6.5 \pm 0.5$  mm a las medidas de tiempo evaluadas. Mientras que los extractos a partir de *H. longipes* y *J. mollis* se comportaron de manera muy similar, mostrando menor inhibición con medidas de 8 a 10 mm a ambas medidas de tiempo; estas medidas fueron comparados con las registradas por clorhexidina con halos de  $9 \pm 1$  y  $10 \pm 1$  mm a las 24 y 48 horas respectivamente, y con hipoclorito de sodio con inhibición de  $24 \pm 0.5$  y  $27 \pm 2$  mm. En cuanto a la actividad antimicrobiana de la concentración al 10% de los extractos contra *P. endodontalis* fue difícil obtener las mediciones, ya que el crecimiento se presentó de manera irregular dificultando el registro, obteniéndose que el extracto que presentó mayor actividad fue el elaborado a partir de *H. Longipes* con halos de inhibición de  $9 \pm 0.5$  mm a las 24 horas y  $8 \pm 1$  mm a las 48 horas, en comparación con los controles CHX con inhibición de  $9 \pm 1$  y  $7 \pm 1.1$  mm, así como NaOCl con  $30 \pm 1$  y  $31 \pm 1$  mm respectivamente (ver tabla 2).

**Tabla3. Promedio de halos de inhibición presentados por la concentración al 5%**

Plantas	<i>T. forsythia</i>		<i>P. endodontalis</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>Schinus molle</i>	10	10	SL	SL	$17 \pm 2$	$13 \pm 1$	$10 \pm 0.5$	$10 \pm 0.5$
<i>Leucophyllum frutescens</i>	$11 \pm 1$	$10 \pm 0.5$	$10 \pm 2$	SL	$7 \pm 0.3$	$7 \pm 1$	$8 \pm 1$	$9 \pm 0.5$
<i>Juglans mollis</i>	$10 \pm 1$	$11 \pm 1$	SL	SL	$7 \pm 1$	$9 \pm 2$	$10 \pm 1$	$9.5 \pm 0.5$
<i>Heliopsis longipes</i>	$11 \pm 2$	$8 \pm 2$	$9 \pm 1$	9	$7.5 \pm 0.5$	$9 \pm 0.5$	$9 \pm 1$	$9 \pm 1$
Clorhexidina	$9 \pm 0.5$	$9 \pm 0.5$	$9 \pm 1$	SL	$7 \pm 0.5$	$9 \pm 1$	$18 \pm 2$	$16 \pm 1.5$
Hipoclorito de Sodio	$22 \pm 3$	$27 \pm 1.7$	$25 \pm 2$	SL	$28 \pm 1$	$27 \pm 1$	$24 \pm 0.8$	$25 \pm 1$

n=3

Los resultados se comportaron de manera similar tanto para la concentración al 5% como al 2.5% de los extractos problema; concluyéndose que los extractos que presentaban mayor actividad eran los elaborados a partir de *Schinus molle* y *Leucophyllum frutescens* (ver tablas 3 y 4).

Plantas	<i>T. forsythia</i>		<i>P. endodontalis</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>Schinus molle</i>	8±1	10±1.5	SL	SL	8±1	7±1	12±0.8	13±1
<i>Leucophyllum frutescens</i>	9±0.5	10±1	9±1	7±1	7	7	9±0.5	9±0.5
<i>Juglans mollis</i>	12±1	10±1	SL	SL	11±1	10±1	8.2±0.3	9.5±0.5
<i>Heliopsis longipes</i>	11±3	7±1	10±1	9±0.5	7±1	8.5±0.5	11±2	8±2
Clorhexidina	9.5±1.5	8±1	14±2	9±0.2	7±1	8±1	9±1	10±1
Hipoclorito de Sodio	20±5	35±4	23±4	14±1	29±2	28±1.5	23.5±0.5	24

n=3

## 2.2 Prueba antimicrobiana mediante difusión en agar en pozo

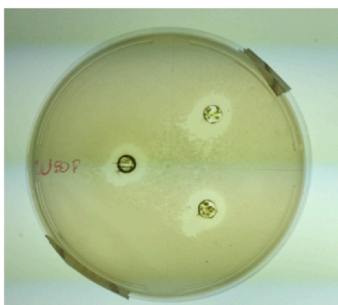


FIG26. Difusión en agar en pozo: inhibición del crecimiento de *P. gingivalis* por extracto de Pirul

En base a lo anterior, se seleccionaron los extractos de *S. molle* y *L. frutescens* en comparación del resto de los extractos analizados para dar continuidad a las siguientes etapas; probándose las mismas concentraciones a las 24 y 48 horas, determinándose que el extracto de *S. molle* mostró la mayor

actividad contra los microorganismos estudio.

**Tabla5. Promedio de halos de inhibición mediante difusión en pozo de la concentración al 10%**

	<i>P. gingivalis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 hrs	48hrs	24 hrs	48 hrs
<i>Schinus molle</i>	14.5±1.5	22.5±1.8	11.5±1	13.5±1.5
<i>Leucophyllum frutescens</i>	19±2	9.75±1.3	16.5±1.8	12.75±1.2
NaOCl 5.25%	15±1.5	15±1	26.5±1	26±1
CHX 2%	21.5±2	30±5	22.5±2	24±2

n=3

Contra *P. gingivalis*, las concentraciones de 10, 5 y 2.5% de *Schinus molle* mostraron halos de 14.5±1.5, 19±1.5 y 17.25±2 mm, respectivamente, a las 24 horas; y de 22.5±1.8, 21.5±1 y 17.5±2.5 mm dichas concentraciones a las 48 horas. Mientras que las concentraciones de 10, 5 y 2.5% de *Leucophyllum frutescens* inhibieron el crecimiento de este microorganismo por 19±2, 7.5±1 y 6.5±0.5 mm a las 24 horas; y 9.75±1.3, 9.75±1.5 y 7±1 mm a las 48 horas. Los resultados fueron evaluados estadísticamente por un análisis de varianza

realizándose comparaciones múltiples sin encontrarse diferencia significativa entre las muestras presentadas y los controles a ambas medidas de tiempo ( $p= 0.058$  a las 24 hrs,  $p= 0.287$  a las 48 hrs.).

**Tabla6. Promedio de halos de inhibición mediante difusión en pozo de la concentración al 5%**

	<i>P. gingivalis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 hrs	48hrs	24 hrs	48 hrs
<i>Schinus molle</i>	19±1.5	21.5±1	11.5±1	14.2±1.5
<i>Leucophyllum frutescens</i>	7.5±1	9.75±1.5	17±2	8±1.5
NaOCl 5.25%	15	15±2	26.5±0.5	26±0.5
CHX 2%	21.5±5	30±4	22.5±2	24±2

n=3

Por otra parte, contra *E. faecalis* todas las concentraciones de *Schinus molle* mostraron halos de 11.5mm a las 24 horas, mientras que a las 48 horas, las concentraciones de 10, 5 y 2.5% presentaron halos correspondientes a 13.5±1.5, 14.25±1.5 y 12.5±1 respectivamente. En cambio, contra este mismo microorganismo, el extracto de *Leucophyllum frutescens* presentó halos de 12.75±1.2, 8±1.5 y 7±3 mm correspondientes a las concentraciones de 10, 5 y 2.5% respectivamente. Al igual que la anterior, los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza múltiple, donde se obtuvieron valores de  $p= 0.058$  para las primeras 24 horas, mientras que un valor  $p=0.137$  transcurridas 48 horas; con lo cual se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ninguna de las muestras de estudio.

**Tabla7. Promedio de halos de inhibición mediante difusión en pozo de la concentración al 2.5%**

	<i>P. gingivalis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 hrs	48hrs	24 hrs	48 hrs
<i>Schinus molle</i>	17.25±2	19.7±2.5	11.5±1	12.5±1
<i>Leucophyllum frutescens</i>	6.5±0.5	7±1	21.5±4	7±3
NaOCl 5.25%	15±1	15±1	26.5±1	26±0.5
CHX 2%	21.5±4	30±2	22.5±3	24±2

n=3

### 3. Identificar la concentración mínima inhibitoria del extracto activo contra los microorganismos patógenos pulpares.

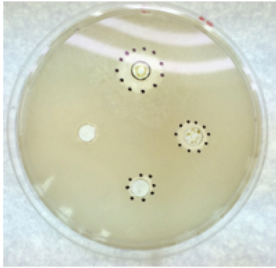


FIG27. Determinación de la CMI del

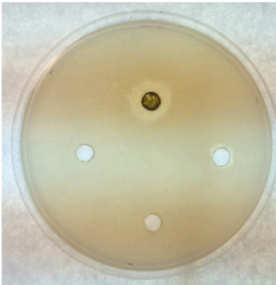


FIG28. Determinación de la CMI del extracto de Pirul sobre *E. faecalis*

Se identificó la concentración mínima inhibitoria del extracto diclorometano-metanol de *Schinus molle* sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Enterococcus faecalis*, obteniéndose que la concentración 0.3% (3mg/mL) y la concentración al 0.07% (0.7mg/mL) correspondían a la CMI contra *Porphyromonas gingivalis* y *Enterococcus faecalis* respectivamente.

### 4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la formulación que incorpora al extracto activo con el principal agente antimicrobiano.

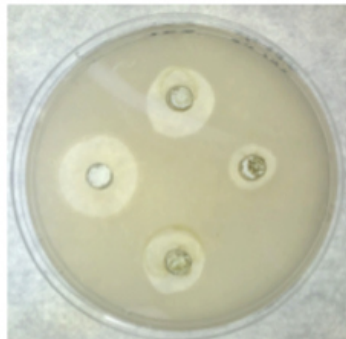


FIG29. Evaluación antimicrobiana de la mezcla activa sobre *E. faecalis*

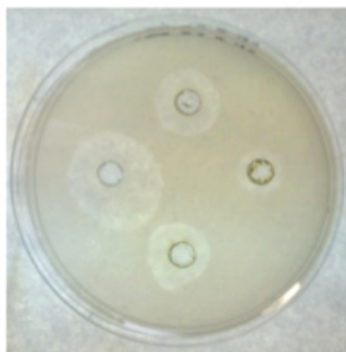


FIG30. Evaluación antimicrobiana de la mezcla activa sobre *P. gingivalis*

Se seleccionó a la clorhexidina como el principal agente antimicrobiano para incorporarse a la formulación junto con el extracto activo, ya que fue la que mostró mayor actividad contra los microorganismos a estudio, obteniéndose resultados favorables para todas las mezclas analizadas, siendo la relación de 1% de clorhexidina con 2% de extracto la que mayor inhibición presentó contra *P. gingivalis* y *E. faecalis* observándose los resultados a las 24 y 48 horas.

Sobre *E. faecalis*, la combinación compuesta por CHX 1% + Extracto 2% (FIG30 pozo superior) presentó un halo con promedio de  $20 \pm 1$ , seguida por la combinación de CHX 1% + Extracto 4% con media de  $19.33 \pm 2.08$  (FIG30 pozo inferior). Las combinaciones de CHX 0.5% + Extracto 6% y CHX 0.5% + Extracto 8% presentaron halos con promedio de  $15.66 \pm 2.08$  y  $15.83 \pm 1.04$ , respectivamente. Los resultados fueron evaluados estadísticamente y agrupados según el análisis en parejas de Fisher (LSD Fisher) donde se asigna una letra a cada muestra, en caso de compartirla, estadísticamente no presentan una diferencia significativa; por lo cual se obtuvo que frente *E. faecalis* la muestra correspondiente a CHX 1% + Extracto 2% no presenta diferencia estadísticamente significativa con el control (CHX al 2%) (Ver tabla 8).

Tabla8. Análisis en parejas de Fisher (LSD) para evaluación antimicrobiana de la formulación contra <i>E. faecalis</i>					
Muestra	N	Media		Agrupación	
CHX 2%	3	22.333	A		
CHX 1% + EXT 2%	3	20	A	B	
CHX 1% + EXT 4%	3	19.33		B	
CHX 0.5% + EXT 6%	3	15.67		C	
CHX 0.5% + EXT 8%	3	15.8333		C	
Extracto puro	3	12.667		D	

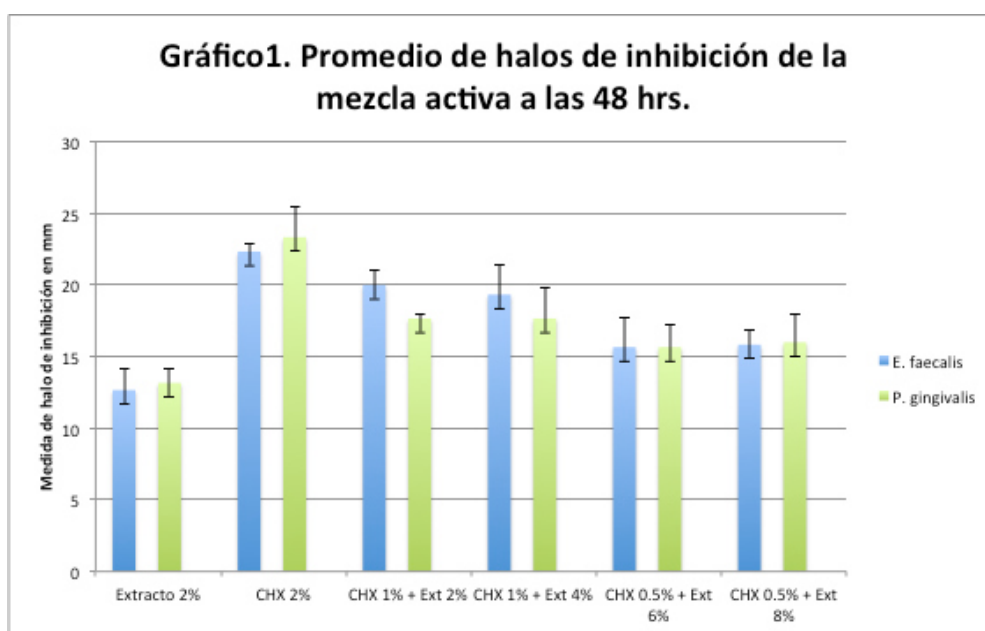
En cambio, sobre *P. gingivalis*, las combinaciones correspondientes a CHX 1% + Extracto 2% y CHX 1% + Extracto 4% (FIG31 pozo superior e inferior respectivamente) presentaron la misma medida promedio de halo inhibitorio de 17.66 mm; siendo seguida por CHX 0.5% + Extracto 8% que presentó una media de  $16 \pm 2$  y CHX 0.5% + Extracto 6% con promedio de  $15.66 \pm 1.52$ . Los resultados también fueron evaluados estadísticamente mediante el análisis en parejas de Fisher (LSD Fisher) siguiendo lo antes descrito y

obteniéndose que contra *P. gingivalis* las formulaciones probadas presentan diferencia estadísticamente significativa con el control, más no presentan diferencia estadísticamente significativa entre ellas y el extracto puro. (Ver tabla 9).

Tabla9. Análisis en parejas de Fisher (LSD) para evaluación antimicrobiana de la formulación contra *P. gingivalis*

Muestra	N	Media	Agrupación
CHX 2%	3	22.333	A
CHX 1% + EXT 2%	3	17.67	B
CHX 1% + EXT 4%	3	17.667	B
CHX 0.5% + EXT 6%	3	15.667	B
CHX 0.5% + EXT 8%	3	16	B
Extracto puro	3	13.167	B

En relación con la inhibición que manifestó el extracto al 2% se presentaron halos con promedio de  $12.66 \pm 1.52$  y  $13.16 \pm 1.04$  sobre *E. faecalis* y *P. gingivalis* respectivamente, los cuales fueron comparados con los halos reportados por Clorhexidina que presentaron en promedio  $22.33 \pm 0.57$  y  $23.33 \pm 2.08$  (Ver gráfica 1).



## 5. Determinación la citotoxicidad presentada por el extracto activo sobre fibroblastos gingivales humanos mediante FMCA.

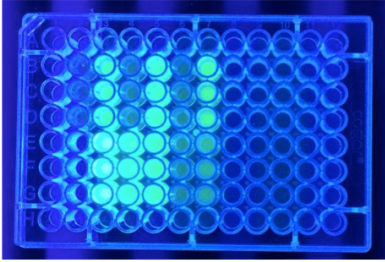


FIG31. Observación de viabilidad celular por medio de fluorescencia a diversos periodos de tiempo

Finalmente para la prueba de citotoxicidad realizada para el extracto de *S. molle* a la concentración de 6.25% podemos mencionar que mostró un comportamiento favorable en comparación a los controles, ya que se observó que mantuvo un 67% de viabilidad celular al analizarse a los

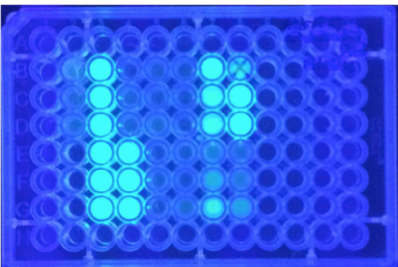
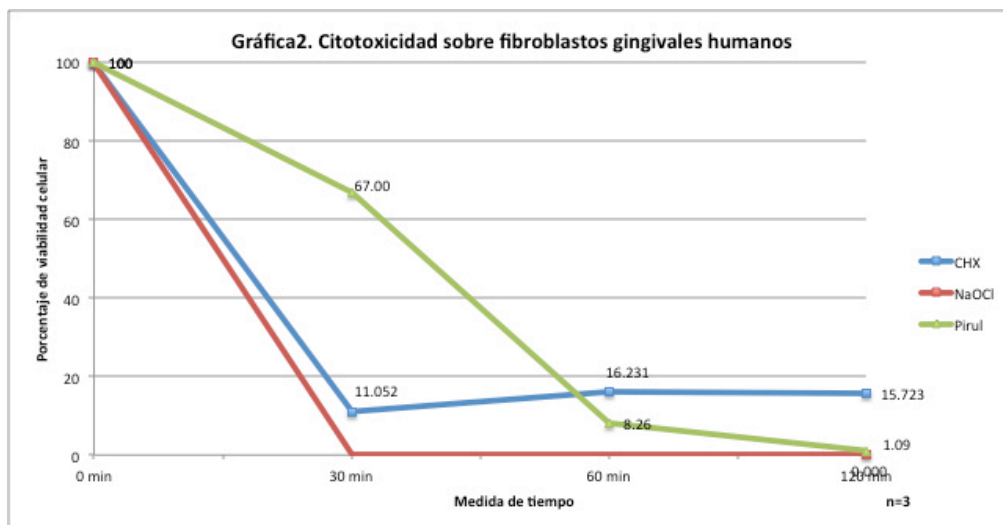


FIG32. Observación de viabilidad celular por medio de fluorescencia a diversas concentraciones

30 minutos de contacto, comparándose con los controles que manifestaron un 11.05 y 0% de viabilidad celular para CHX(.2%) y NaOCl, respectivamente.

Por otro lado, al evaluarse el extracto a los 60 minutos de contacto con las células la viabilidad disminuyó considerablemente 8.26%, pero al compararse con los controles positivos no fue posible obtener un dato de lectura para la clorhexidina y siendo 0% de viabilidad para el hipoclorito de sodio.



Mientras que al evaluarse a los 120 minutos el extracto mantuvo la viabilidad celular en un 1.09% contrario a los controles que a partir de los 30 minutos ya no posible observar viabilidad (Ver gráfica 2).

**6. Efectuar la evaluación fitoquímica de los extractos del extracto activo mediante pruebas químicas preliminares para la identificación parcial de grupos químicos.**

En cuanto al análisis fitoquímico por espectrometría de masas, se obtuvo que la muestra resultaba positivo a taninos y flavonoides, mismos que se presumen pudieran ser responsables de su actividad.

## 8. DISCUSIÓN

Aproximadamente el 34% de todos los casos en los que se requiere un tratamiento de endodoncia presentan un proceso infeccioso y lesión periapical (Fouad y Burleson, 2003).

Lin et al. encontraron una relación proporcional del número de bacterias presentes con la aparición de una lesión periapical (Lin et al., 1991).

Entre los géneros patógenos oportunistas más prevalentes se encuentran *Fusobacterium*, *Treponema*, *Tannerella*, *Porphyromonas* y *Prevotella* (Siqueira y Rocas., 2009). Según estudios recientes, entre las bacterias más asociadas al desarrollo de periodontitis apical y resistencia a los métodos de desinfección se incluyen *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas endodontalis* (Hong et al., 2015), *Porphyromonas gingivalis* y *Tanerella forsythensis*; estos dos últimos encontrados en biofilms extrarradiculares (Conrads et al., 1997). Es por esto que en la presente investigación se trató de seleccionar las bacterias que reportaran mayor aparición y resistencia en las lesiones periapicales y casos de fracaso endodóntico, ya que constituyen los microorganismos más difíciles de eliminar.

El tratamiento de endodoncia tendrá como objetivo entonces la desinfección del sistema de conductos radiculares así como los túbulos dentinarios, para lo cual requerirá de agentes irrigantes (Hertel et al., 2016). Esta desinfección puede condicionarse por una serie de factores, como el tiempo de contacto del irrigante, la temperatura y/o activación del mismo, el número de citas, el estado inicial del paciente. En promedio, un tratamiento de endodoncia es llevado a cabo en un lapso de 1 hora y media, con tiempo de contacto del irrigante de 35 min aproximadamente.

Actualmente los agentes irrigantes más empleados incluyen el hipoclorito de sodio y la clorhexidina, mismos que a pesar de tener ventajas y alta efectividad, presentan efectos adversos considerables cuando no son manipulados con precaución y son extruídos al periápice, presentándose alta toxicidad con manifestaciones clínicas severas (Vinothkumar et al., 2013), desarrollo de resistencia bacteriana y pigmentación dental (Agarwal et al., 2010). Es por esto que se concuerda con lo publicado por Bhardwaj et al. donde actualmente el empleo de fitomedicamentos en diversas ramas de la odontología ha ganado popularidad debido a sus efectos secundarios menores (Bhardwaj et al., 2012).

En endodoncia diversas plantas han sido probadas con diferentes fines terapéuticos, por ejemplo: medicamento intraconducto a base de Aloe vera (Chandrappa et al., 2015), Neem como agente de desinfección de dentina (Mistry et al., 2015), preparados a base de extractos naturales como irrigantes endodónticos (Mathew et al., 2015), entre otros.

En la presente investigación se seleccionaron 4 plantas de la región de las cuales se reportan diversos efectos terapéuticos. Anteriormente Salazar et al. reportaban la actividad fungicida y antibacteriana de *Schinus molle* o Pirul contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (Salazar et al., 2011). Por otra parte *Leucophyllum frutescens* o Cenizo había sido evaluado como agente antimicrobiano y antituberculosis por Molina et al. en el 2007. También anteriormente había sido evaluado con efecto antituberculoso el Nogal o *Juglans mollis*, reportando gran actividad y cuyas investigaciones siguen en proceso (Cruz et al., 2008). Así mismo, el efecto analgésico y antiinflamatorio de *Heliopsis longipes* ya había sido reportado (Ortiz et al., 2009). Sin embargo, no se encontró ninguna publicación en la que se empleara alguna de estas plantas con fines antimicrobianos sobre patógenos pulpaes en endodoncia; por lo que se planteó la idea de evaluar su actividad antimicrobiana y citotóxica en comparación con los agentes más comunmente usados.

El proceso de extracción seleccionado para la realización de este proyecto fue la técnica de maceración siguiendo el proceso también descrito por Kefe et al. en el 2016, en el que las plantas se trituraban y se ponían en contacto con el solvente en agitación; finalmente, el total filtrado de cada planta se colocó en el rotoevaporador (Kefe et al., 2016). Sin embargo, existen otros procedimientos y aparatos que pueden producir la extracción, como el aparato de Soxhlet empleado por Chandra et al. en el 2016 en el que se emplea un solvente y diferentes temperaturas para producir la separación química (Chandra et al., 2016). Se prefirió utilizar la técnica de maceración en frío debido a que en algunas plantas la manipulación térmica puede producir la pérdida de sustancias activas por termolabilidad, por lo que podría alterarse su actividad terapéutica.

Existen numerosos solventes que pueden ser empleados para producir la extracción química de diferentes compuestos, que como menciona Creusot et al. en el 2016 pueden incluir acetona, metanol, diclorometano, heptano, mezcla de diclorometano-metanol, entre otros (Creusot et al., 2016).

En estudios anteriores, como el presentado por Alves et al. y Alejandre et al. ambos en el 2015, se probaron diferentes solventes en el mismo método de extracción, resultando mayor eficiencia cuando se utilizaba la mezcla de diclorometano-metanol (Alejandre et al., 2015) (Alves et al., 2015). Por lo cual, en el presente estudio se decidió utilizar la mezcla de estos solventes en proporción 1:1 con el fin de extraer la mayor cantidad de compuestos activos posibles de las plantas prueba.

Para la evaluación antimicrobiana, se realizaron dos pruebas mediante difusión en agar. La primera fue por medio de sensidiscos, la cual es una prueba simple, bien estandarizada, poco costosa y que no requiere un equipo especializado (Jorgensen y Ferraro, 2009). En el presente estudio, esta técnica fue empleada para el screening antimicrobiano.

La segunda técnica empleada como análisis antimicrobiano y determinación de la concentración mínima inhibitoria fue la técnica de difusión en agar mediante pozo. Esta técnica presenta ventajas como la fácil visualización y recolección de resultados, así como la cuantificación selectiva de microorganismos (Shetty et al., 2016). En adición, esta técnica es muy utilizada para la evaluación antimicrobiana de extractos de plantas sobre microorganismos diana; reportándose también anteriormente en artículos de Chandra et al. 2016, Shetty et al. 2016, Ogidi et al. 2015, entre otros.

Anteriormente se había evaluado la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Schinus molle* contra *E. faecalis* en el estudio publicado por Salazar et al., 2011, obteniéndose inhibición del crecimiento bacteriano, concordando con los resultados mostrados en la presente investigación. En dicha investigación, donde se siguió la misma metodología para la técnica de difusión en agar mediante pozo, también se probó el extracto obtenido a partir de las flores de dicha planta, lo cual se sugiere también para futuros experimentos (Salazar et al., 2011). Por otra parte, no existe actualmente un reporte donde se analice la actividad antimicrobiana del resto de los extractos sobre los microorganismos patógenos pulpares usados como prueba.

Sin embargo, otras plantas han sido probadas como irrigantes o medicamento intraconducto siguiendo diferentes metodologías.

Tal es el caso de lo expuesto por Podar et al., 2015 donde se comprueba la capacidad antimicrobiana de extractos de *Morinda citrifolia* y *Azadirachta indica*, evaluándose *in vivo* la disminución de la carga bacteriana luego de la irrigación con dichos extractos durante el tratamiento de endodoncia, tomándose una muestra previa y una posterior con una punta de papel y realizando conteo de las UFC para posteriormente compararlo con los resultados obtenidos luego de la irrigación con NaOCl al 3% (Podar et al., 2015).

Por otra parte, en el estudio denominado “Comparative evaluation of antimicrobial activity of hydroalcoholic extract of Aloe vera, garlic, and 5% sodium hypochlorite as root canal irrigants against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study”, se analiza mediante la técnica de difusión en agar, empleado también en este estudio, la actividad antimicrobiana de diferentes extractos sobre *E. faecalis*, que como mencionamos anteriormente es uno de los microorganismos más resistentes durante el tratamiento endodóntico. Al igual que en la presente investigación, los resultados fueron comparados con el gold estándar de la irrigación, obteniéndose excelentes resultados luego de la aplicación de los extractos naturales (Karkare et al., 2015).

En la presente investigación se encontró que la concentración mínima inhibitoria del extracto de Pirul contra *E. faecalis* era 0.07% equivalente a 0.7mg sobre 1mL de vehículo; lo cual se encuentra en las medidas promedio para la evaluación de un extracto sobre dicho microorganismo, concordando por ejemplo con Arias et al., 2004 que encontraron la MIC de *Acacia Aroma* contra dicho microorganismo en valores de entre 0.067 to 0.308 mg/ml (Arias et al., 2004).

En cuanto a la inhibición del crecimiento de *P. gingivalis*, en otros estudios se había encontrado en concentraciones del 1.74- 3.48 mg/ml (Iwaki et al., 2006) concordando con la presente investigación que encontró la MIC en la concentración al 0.3% correspondiente a 3mg/ml.

De acuerdo a la elaboración de una formulación que incorpore un agente antimicrobiano con un extracto vegetal, se tiene como antecedente el artículo “In vitro antimicrobial and anti-endotoxin action of *Zingiber Officinale* as auxiliary chemical and medicament combined to calcium hydroxide and chlorhexidine” (Valera et al., 2015) donde se evaluaba la combinación de la planta *Zingiber Officinale* con hidróxido de calcio y clorhexidina en

cuanto a su capacidad antimicrobiana y anti-endotoxinas; obteniéndose excelentes resultados y proponiéndose como auxiliar en la medicación intraconducto en contacto con el hidróxido de calcio al disminuir considerablemente la cantidad de endotoxinas y la carga bacteriana. En el presente estudio, se evaluó la capacidad antimicrobiana de la combinación del extracto de *S. molle* y clorhexidina comparándose con la inhibición presentada por la clorhexidina al 2%, manteniéndose el efecto antimicrobiano empleando una concentración efectiva del extracto y una menor concentración de la clorhexidina; por lo cual se propone como auxiliar químico en la desinfección de conductos radiculares durante el tratamiento de endodoncia.

Para el análisis de los compuestos fitoquímicos activos, se decidió realizar una cromatografía de gases acoplado a masas, ya que este análisis permite la identificación y cuantificación de los compuestos activos del extracto de estudio, recolectando los componentes responsables de la actividad terapéutica. Este análisis ya ha sido reportado en otros estudios como el publicado por Pitakpawasutthi et al., en el 2016 donde se emplea para la identificación de los componentes del extracto aplicado a patógenos pulpares.

En cuanto a la citotoxicidad, se decidió la evaluación de la misma sobre células epiteliales humanas por medio de fluorescencia, ya que como se mencionó anteriormente, este tipo de estudios evitan el empleo de animales, así como permiten la obtención de resultados de una manera más confiable y con una menor cantidad de muestra (Mata et al., 2013). Sin embargo, otros estudios han empleado distintas metodologías para la evaluación toxicológica de los extractos, como es el caso de Caprioli et al., en el 2016 donde se empleó la técnica de MTT para obtener la toxicidad del extracto de Naviglio sobre células tumorales (Caprioli et al., 2015). Este estudio se basa en la medición de la absorbancia así como un cambio de coloración al agregarse el compuesto principal, lo cual resulta un

método frecuentemente usado por la fácil evaluación de resultados; sin embargo, en la presente investigación no fue posible su empleo debido a que el extracto crudo presenta una coloración oscura, misma que al medir la absorbancia por el color propio del extracto interfiere en la medición dando resultados erróneos.

En la presente investigación se decidió determinar la citotoxicidad sobre células epiteliales humanas al ser más específico el enfoque; obteniéndose que el extracto elaborado de *Schinus molle* mantenía la viabilidad pulpar en más del 50% a comparación de los controles.

Estudios previos demuestran la alta toxicidad de la clorhexidina, comprobándose toxicidad severa al minuto uno de exposición con 0.72% de viabilidad celular y daño al ADN al colocarse sobre células epiteliales humanas (Cabral y Hernández, 2016), esto concuerda con la presente investigación al observarse la disminución de la viabilidad celular; sin embargo, las mediciones posteriores a los 30 minutos no pudieron obtenerse de manera confiable debido a la formación de un precipitado al entrar en contacto la clorhexidina con el medio MEM.

## 9. CONCLUSIONES



- Los extractos diclorometano-metanol obtenidos a partir de *Schinus molle*, *Leucophyllum frutescens*, *Juglans mollis* y *Heliopsis longipes* presentan actividad antimicrobiana frente a *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella Forsythia*, *Porphyromonas endodontalis* y *Enterococcus faecalis*, microorganismos presentes en patologías pulpares.
- El extracto de *Schinus molle* (Pirul) presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos evaluados.
- Fue posible elaborar una formulación que mantenga el efecto antimicrobiano empleando una concentración efectiva del extracto y una menor concentración de la clorhexidina, por lo que se propone el empleo de la formulación correspondiente a 1% de clorhexidina + 2% del extracto como un auxiliar químico en la desinfección de conductos radiculares.
- El extracto de Pirul mostró menor toxicidad al mostrar más del 50% de viabilidad celular comparado con los tratamientos convencionalmente empleados bajo las condiciones experimentales analizadas.
- Los principios activos con mayor presencia en el extracto de *Schinus molle* fueron taninos y flavonoides.

Esta investigación permitirá el uso de extractos vegetales como auxiliares químicos en la irrigación durante la terapia pulpar y pasan a convertirse en una promesa para la investigación de principios activos de origen natural que incorporados a una mezcla química favorezcan la desinfección del sistema de conductos radiculares.

Se recomienda, en futuras investigaciones, la evaluación de la mezcla activa propuesta como irrigante en piezas extraídas para valorar la penetración, actividad en tiempo real y fácil eliminación. Posteriormente y en caso de resultados favorables, su evaluación in vivo y aplicación endodóntica.



## 10. APÉNDICES

Apéndice A: Instrumento de recolección de la prueba de solubilidad.


 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLÓGIA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> <small>Jessica Patricia Arellano Barrientos</small> <small>"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"</small> 						
Tabla 1. Prueba de solubilidad						
Planta	Etanol 100%	Etanol 50%	Agua	Etanol 10%	Etanol 20%	DMCO
Hojas de cenizo						
Hojas de cenizo						
Hojas de pirul						
Corteza de H. Long						

+++ alta solubilidad ++mediana solubilidad +naja/nula solubilidad


Apéndice B: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Porphyromonas gingivalis* a las 24 horas

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLÓGIA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> <small>Jessica Patricia Arellano Barrientos</small> <small>"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"</small> 				
Tabla 2. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 horas				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice C: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Tanerella forsythia* a las 24 horas.

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 3. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Tanerella forsythia</i> a las 24 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice D: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Porphyromonas endodontalis* a las 24 horas.

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 4. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Porphyromonas endodontalis</i> a las 24 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice E: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Enterococcus faecalis* a las 24 horas.

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 5. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Enterococcus faecalis</i> a las 24 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice F: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Porphyromonas gingivalis* a las 48 horas

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 6. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 48 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice G: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Tanerella forsythia* a las 48 horas.

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 7. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Tanerella forsythia</i> a las 48 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice H: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Porphyromonas endodontalis* a las 48 horas.

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 8. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Porphyromonas endodontalis</i> a las 48 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				


Apéndice I: Prueba antimicrobiana en sensidisco para *Enterococcus faecalis* a las 48 horas.

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 9. Prueba microbiológica mediante sensidisco para <i>Enterococcus faecalis</i> a las 48 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Corteza de nogal	Hojas de pirul	Raiz de H. Long
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				



Apéndice J: Prueba antimicrobiana en pozo para *Porphyromonas gingivalis* a las 24 horas

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 10. Prueba microbiológica mediante pozo para <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo 1	Hojas de cenizo 2	Hojas de pirul 1	Hojas de pirul 2
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				



Apéndice K: Prueba antimicrobiana en pozo para *Enterococcus faecalis* a las 24 horas

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> Jessica Patricia Arellano Barrientos "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"				
<b>Tabla 11. Prueba microbiológica mediante pozo para <i>Enterococcus faecalis</i> a las 24 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo 1	Hojas de cenizo 2	Hojas de pirul 1	Hojas de pirul 2
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				

Apéndice L: Prueba antimicrobiana en pozo para *Porphyromonas gingivalis* a las 48 horas

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> <small>Jessica Patricia Arellano Barrientos</small> <small>"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"</small> 				
<b>Tabla 12. Prueba microbiológica mediante pozo para <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 48 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo	Hojas de cenizo	Hojas de pirul	Hojas de pirul
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				

Apéndice M: Prueba antimicrobiana en pozo para *Enterococcus faecalis* a las 48 horas

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> <small>Jessica Patricia Arellano Barrientos</small> <small>"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"</small> 				
<b>Tabla 13. Prueba microbiológica mediante pozo para <i>Enterococcus faecalis</i> a las 48 horas</b>				
Plantas	Hojas de cenizo 1	Hojas de cenizo 2	Hojas de pirul 1	Hojas de pirul 2
Dilución 1				
Dilución 2				
Dilución 3				
C+1				
C+2				
C-				

Apéndice N: Determinación de la CMI mediante difusión en agar en pozo del extracto de hojas de pirul sobre *P. gingivalis*

 <b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b> <b>POSGRADO DE ENDODONCIA</b> <small>Jessica Patricia Arellano Barrientos</small> <small>"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"</small> 			
<b>Tabla 14. Determinación de CMI de extracto de hojas de pirul sobre <i>P. gingivalis</i></b>			
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
D1			
D2			
D3			
D4			
D5			
D6			
D7			
D8			
D9			
D10			



Apéndice Ñ: Determinación de la CMI mediante difusión en agar en pozo del extracto de hojas de pirul sobre *E. faecalis*


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**POSGRADO DE ENDODONCIA**  
Jessica Patricia Arellano Barrientos  
**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"**


**Tabla 15. Determinación de CMI de extracto de hojas de pirul sobre *E. faecalis*.**

	Repeticón 1	Repeticón 2	Repeticón 3
D1			
D2			
D3			
D4			
D5			
D6			
D7			
D8			
D9			
D10			

Apéndice O: Evaluación antimicrobiana de la mezcla activa sobre *Enterococcus faecalis* a las 48 horas


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**POSGRADO DE ENDODONCIA**  
Jessica Patricia Arellano Barrientos  
**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"**


**Tabla 15. Determinación de CMI de extracto de hojas de pirul sobre *E. faecalis*.**

	Repeticón 1	Repeticón 2	Repeticón 3
D1			
D2			
D3			
D4			
D5			
D6			
D7			
D8			
D9			
D10			

Apéndice P: Evaluación antimicrobiana de la mezcla activa sobre *Porphyromonas gingivalis* a las 48 horas

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE ODONTOLÓGIA POSGRADO DE ENDODONCIA Jessica Patricia Arellano Barrientos <i>"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS PULPARES"</i> 			
Tabla 16. Determinación de CMI de extracto de hojas de pirul sobre <i>P. gingivalis</i>			
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
D1			
D2			
D3			
D4			
D5			
D6			
D7			
D8			
D9			
D10			

## 11. LITERATURA CITADA

- Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Van Benthem J, Zuang V, Andersen K, Angers-Loustau , Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems I, Bois F, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard, T, Casati S Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G. Dekant W. Et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. *Archives of Toxicology*. 2010;85(5):367-485.
- Agarwal P, Nagesh L, Murlikrishnan Evaluation of the antimicrobial activity of various concentrations of Tulsi (*Ocimum sanctum*) extract against *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2010;21:357–9.
- Alanís Garza B, Salazar Aranda R, Ramírez Durón R, Garza González E, Waksman de Torres N. A new antimycobacterial furanolignan from *Leucophyllum frutescens*. *Nat Prod Commun*. 2012;7(5):597-8.
- Alejandre-García I, Álvarez L, Cardoso-Taketa A, González-Maya L, Antúnez M, Salas-Vidal E, Díaz JF, Marquina-Bahena S, Villarreal ML. Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scabrellum*: Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:298463.

- Alves R, Preto M, Vasconcelos V, Oliveira RS, Martins R. Cytotoxicity Induced by Extracts of *Pisolithus tinctorius* Spores on Human Cancer and Normal Cell Lines-Evaluation of the Anticancer Potential. *J Toxicol Environ Health A*. 2015;78(13-14):840-7.
- Arias ME, Cudmani NM, Gómez JD, Vattuone Ma, Isla MI. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences*. 2004;75(2):191-202.
- arsson R, Nygren P. A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. *Anticancer Res*. 1989;9:1111–1119.
- Ashu Sharma. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontology 2000*. 2010;54:106–116.
- Atlas DM, Missana L, Leonardi LE, Raiden G. Limpieza y conformacion del tercio apical de conductos curvos. *Endodoncia*. 2010;28(1):12-18.
- Avello L. M, Cisternas F. I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile* 2010;138(10).
- Azmir J, Zaidul, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F,., Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN,., Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 2013;117:426–436.
- Baquerizo Paye EA. Analisis del precipitado formado en interacción entre el hipoclorito de sodio y la clorhexidina. Tesis 2014. Universidad de Guayaquil. Facultad piloto de odontología.

- Berman LH, Hartwell GR. Capítulo 1: Diagnóstico. Libro: Vías de la pulpa, Cohen y Hargreaves. 10ma edición, Ed. Elsevier Mosby 2011.
- Bhardwaj A, Ballal S, Velmurugan N. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citifolia*, papain and aloe vera (all in gel formulation), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2012;15:293–7.
- Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista, AC, Alencar AH, Estrela C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *Int. Endod. J.* 2010;43(11):1013-21.
- Cabral Romero C, Hernández Delgadillo R. Efectos citotóxicos de gluconato de clorhexidina en células epiteliales. *Rev estomatol mex.* 2016;3(1):20-28.
- Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys Mollis* (muña). *Rev. perú. med. exp. salud publica.* 2008;25(3):298-301.
- Cañigueral S, Dellacassa E, Bandoni A. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. *Acta Farm. Bonaerense.* 2003;22(3):265-78.
- Caprioli G, Iannarelli R, Sagratini G, Vittori S, et al. Phenolic acids, antioxidant and antiproliferative activities of Naviglio® extracts from *Schizogyne sericea* (Asteraceae). *Nat Prod Res.* 2016;7:1-8. [
- Cárdenas Bahena A, Sánchez García S, Tinajero Morales C, Gonzalez Rodriguez VM, Baires Varguez L. Hipoclorito de sodio en irrigación de

conductos radiculares: Sondeo de opinión y concentración en productos comerciales. Rev Odont Mex. 2012;16(4):252-258.

- Castilho AL, Saraceni CH, Díaz IE, Paciencia ML, Suffredini IB. New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. Braz Oral Res. 2013;27(2):109-15.
- Castillo Perez AM, Liebana Ureña J, Andrés Gomez MT. Bacterias anaerobias estrictas de interés óral (III). Anaerobios no esporulados. Capítulo 36. Libro: Microbiología oral segunda edición. 2002.
- Chandra Shekar BR, Nagarajappa R, Jain R, Singh R, Thakur R, Shekar S. Antimicrobial efficacy of *Acacia nilotica*, *Murraya koenigii* (L.) Sprengel, *Eucalyptus hybrid*, *Psidium guajava* extracts and their combination on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. Dent Res J (Isfahan). 2016 Mar-Apr;13(2):168-73.
- Chandrappa PM, Dupper A, Tripathi P, Arroju R, Sharma P, Sulochana K. Antimicrobial activity of herbal medicines (tulsi extract, neem extract) and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in Endodontics: An in vitro study. J Int Soc Prev Community Dent. 2015;5(Suppl 2):S89-92.
- Chaquilla Quilca G, Estela Escalante WD, Torres Munoz V, Ballinas Casarrubias ML, Gastelúm Franco MG, Nevárez Moorillón GV. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña *Minthostachys setosa* Briq Epl y anís *Pimpinella anísom* L. ECI Perú 2011;8(2):107-111.

- Choon Yoong Cheok, Hanaa Abdel Karim Salman, Rabiha Sulaiman. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International* 2014;59:16–40.
- CONAFOR, SEMARNAT. *Schinus molle*. Ficha técnica. 2014.
- Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of 16S r DNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod.* 1997;23:433–8.
- Corona Tabares MG, Montoya Gutiérrez S, Ortega Torres B, Aguiar Fuentes EG. Dehiscencia de tejido por contacto con hipoclorito de sodio *Revista Tamé.* 2013(4):119-120. 2013.
- Costa EM, Evangelista AP, Medeiros AC, Dametto FR, Carvalho RA. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. *Braz Oral Res.* 2012;26(3):215-21.
- Creusot N, Dévier MH, Budzinski H, Aït-Aïssa S. Evaluation of an extraction method for a mixture of endocrine disrupters in sediment using chemical and in vitro biological analyses. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Jan 30
- Cruz Vega DE, Verde Star MJ, Salinas González N, Rosales Hernández B, Estrada García I, Mendez Aragón P, Carranza Rosales P, González Garza MT, Castro Garza J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytother Res.* 2008;22(4):557-9.
- Cruz-Vega DE, Verde-Star MJ, Salinas-González N, Rosales-Hernández B, Estrada-García I, Mendez-Aragón P, Carranza-Rosales P, González-Garza

MT, Castro-Garza J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytother Res.* 2008;22(4):557-9.

- de Castilho AL, da Silva JP, Saraceni CH, Díaz IE, Paciencia ML, Varella AD, Suffredini IB. In vitro activity of Amazon plant extracts against *Enterococcus faecalis*. *Braz J Microbiol.* 2014;45(3):769-79.
- Del Castillo UgeDo G, Perea Pérez B, Labajo gonzález E, Santiago Sáez A, García Marín F. Lesiones por hipoclorito sódico en la clínica odontológica: causas y recomendaciones de actuación. *Cient. dent.* 2011;8(1):71-79.
- Díaz LK, Moromi NH. Determinación antibacteriana in vitro de *Mentostachys mollis* (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. *Odontol. Sanmarquína* 2005;8(2):3-5.
- Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Raisa Zhurbenko C. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2010;48(2):147-161.
- Díaz Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* 2012;5(1):40-45.
- eciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 2000;26:593–595

- Fentem J.H. The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Human Experimental Toxicology* 1994;13(2):445-449.
- Fernandez Calienes Valdes A, Mendiola Martínez J, Monzote Fidalgo L, García Parra M, Sariago Ramos I, Acuña Rodríguez D, Scull Lizama R, Gutiérrez Gaitén Y. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop.* 2009;61(3):254-258.
- Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc.* 2003;134:43–51.
- Furuya Meguro AT, Arroniz Padilla S, Vaca Pacheco S, Paniagua Contreras GL, Monroy Péres E, Hernández Gomes L. Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calico y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar. *Rev Oral.* 2007;8(24):374-379.
- Gándara E, Sosa V. Testing the monophyly and position of the North American shrubby desert genus *Leucophyllum* (Scrophulariaceae: Leucophylleae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2013.
- Gentil M, Pereira JV, Sousa YT, Pietro R, Neto MD, Vansan LP, de Castro França S. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytother Res.* 2006;20(3):184-6.

- Gomes BPFA, Pinheiro ET, GadeA Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root Canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-76.
- Gualtieri M, Araque M, Carmona J, Garcia M, Di Bernardo M, Rios N, Villalobos c, Fung Y, Uscategui N, Sosa F. Actividad antibacteriana del *Schinus molle* l cultivado en Italia. *Rev. Inst. Nac. Hig.* 2012;43(2):3-10.
- Halkai R, Hegde MN, Halkai K. Evaluation of the presence of *Enterococcus Faecalis* in root cementum: A confocal laser scanning microscope analysis. *J Conserv Dent.* 2014;17(2):119–123.
- Herrera M, Vargas A ,Campos M. Aislamientos de *Enterococcus spp.*, resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños.* 1998;33:1-2.
- Hertel M, Sommer K, Kostka E, Imiolczyk SM, Ballout H, Preissner S. Outcomes of Endodontic Therapy Comparing Conventional Sodium Hypochlorite Irrigation with Passive Ultrasonic Irrigation Using Sodium Hypochlorite and Ethylenediaminetetraacetate. A Retrospective Analysis. *Open Dent J.* 2016 Aug 12;10:375-81.
- Hong L, Hai J, Yan-Yan H, Shenghui Y, Benxiang H. Colonization of *Porphyromonas endodontalis* in primary and secondary endodontic infections. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2015;33(1):88-92.
- Hotwani K, Baliga S, Sharma K. J Phytodentistry: use of medicinal plants. *Complement Integr Med.* 2014 (En impresión)

<http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temas-forestales/reforestacion/fichas-tecnicas>

- Iwaki K, Koya-Miyata S, Kohno K. Antimicrobial activity of *Polygonum tinctorium* Lour: extract against oral pathogenic bacteria. *Journal of natural medicines*. 2006;60(2):121-5.
- Jara Chalco LB, Zubiate Meza JA. Retratamiento endodóntico no quirúrgico. *Rev Estomatol Here- diana*. 2011; 21(4):231-236.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(11):1749-55.
- Kaptan F, Güven EP, Topcuoglu N, Yazici M, Külekçi G. In vitro assessment of the recurrent doses of topical gaseous ozone in the removal of *Enterococcus faecalis* biofilms in root Canals. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2014;17(5)
- Karkare SR, Ahire NP, Khedkar SU. Comparative evaluation of antimicrobial activity of hydroalcoholic extract of *Aloe vera*, garlic, and 5% sodium hypochlorite as root canal irrigants against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2015;33(4):274-8.
- Kefe A, Giday M, Mamo H, Erko B. Antimalarial properties of crude extracts of seeds of *Brucea antidysenterica* and leaves of *Ocimum lamiifolium*. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):118.
- Lakshmi L Narayanan and C Vaishnavi Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010;13(4):233–239.

- Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71:603–11.
- Lindhagen E, Nygren P, Larsson R. The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc.* 2008;3(8):1364-9.
- Lombardo Bedran TB, Marcantonio RM, Spin Neto R, Pinto Alves Mayer M, Grenier D, Spolidorio LC, Palomari Spolidorio D. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study *J Oral Microbiol.* 2012;4:10.
- López Marcos JF. Etiología, clasificación y patogenia de la patología pulpar y periapical. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9:52-62.
- Luna CV. Distribución e importancia maderera de la familia anacardiáceas en el gran chaco argentino. *Ra Ximhai* 2012;8(3):83-95.
- Mangas Marín R, Montes de Oca Porto R, Nival Vazquez A, Bello Alarcón A. Caracterización por cromatografía de Gases/espectometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm.* 27. 2008(5):747-51
- Martínez M. 1979. *Plantas Mexicanas, Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos.* Fondo de Cultura Económica. México. 636 y 1142.
- Martínez MM, Ocampo DM, Galvis JH, Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Rev Cubana Plant Med.* 2011;16(4):313-323.

- Mata Miranda M, Vázquez-Zapién GJ, Sánchez-Monroy V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*. 2013;27(3):194-9.
- Mathew J, Pathrose S, Kottoor J, Karaththodiyil R, Alani M, Mathew J. Evaluation of an Indigenously Prepared Herbal Extract (EndoPam) as an Antimicrobial Endodontic Irrigant: An Ex Vivo Study. *J Int Oral Health*. 2015 Jun;7(6):88-91.
- Melo de Brito Costa EM, Araujo Evangelista AP, Dantas de Medeiros AC, Roberto Dametto F, Andrade de Carvalho R. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. *Brazilian Oral Research*. 2012;26(3):215.
- Melo de Brito Costa EM, Siqueira Barbosa A, Antunes de Arruda T, Teixeira de Oliveira P, Roberto Dametto F, Andrade de Carvalho R, Dores Melo M. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(3):175-180.
- Mendonça Rocha PM, Rodilla JM, Díez D, Elder H, Guala MS, Silva LA, Baltazar Pombo E. Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.) *Molecules*. 2012;17(10):12023-12036.
- Mistry KS, Sanghvi Z, Parmar G, Shah S, Pushpalatha K. Antibacterial efficacy of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi* and 2% CHX on multispecies dentinal biofilm. *J Conserv Dent*. 2015;18(6):461-6.
- Molina Salinas GM, Pérez López A, Becerril Montes P, Salazar Aranda R, Said Fernández S, de Torres NW. Evaluation of the flora of northern Mexico

for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. J Ethnopharmacol. 2007;109(3):435-41.

- Molina Torres J, Salazar Cabrera CJ, Armenta Salinas C, Ramírez Chávez E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. J Agric Food Chem. 2004;52(1):4700-04.
- Molina Torres J, Salgado Garciglia R, Ramirez Chavez E, Del Rio RE. Purely Olefinic Alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acme//a* (*Spilanthes oppositifolia*). Biochemical Systematics and Ecology. 1996; 24(1):43-47.
- Molina Torres, J, García Chávez A, Ramírez Chávez E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. Journal of Ethnopharmacology. 1999;64(3):241-248.
- Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, de Torres NW. Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. Ethnopharmacol. 2007;109(3):435-41
- Mora FD, Araque M, Rojas LB, Ramirez R, Silva B, Usubillaga A. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. Natural Product Communications 2009;4(7):997-1000.

- Moreno Montoya A, Cañada Rodríguez A, Antúnez Coca J, Díaz Montes de Oca CI, Pineda A. Uso de la fitoterapia en 3 clínicas estomatológicas de Santiago de Cuba. Rev. Medisan 2011;15(4):489-494.
- Ogidi OC, Oyetayo VO, Akinyele BJ. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Extracts Obtained from Raw and Fermented Wild Macrofungus, *Lenzites quercina*. Int J Microbiol. 2015;2015:106308.
- Orozco Guanoluisa MA. Evaluación de la Actividad Cicatrizante de un Gel Elaborado a base de los Extractos de Molle (*Schinus molle*), Cola de Caballo (*Equisetum arvense* L.), Linaza (*Linum usitatissimum* L.) en Ratones (*Mus musculus*). Tesis. 2013
- Ortiz MI, Cariño-Cortés R, Pérez-Hernández N, Ponce-Monter H, Fernández-Martínez E, Castañeda-Hernández G, Acosta-Madrid II, Cilia-López VG. Antihyperalgesia induced by *Heliopsis longipes* extract. Proc West Pharmacol Soc. 2009;52:75-7.
- Pamplona Roger J. Enciclopedia de las plantas medicinales; Madrid España, Ed. Safeiliz, S.L., 2008. 76-78
- Pino Perez O, Jorge Lazo F. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Rev. Protección Veg. 2010;25(1):34-43.
- Pitakpawasutthi Y, Thitikornpong W, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Chlorogenic acid content, essential oil compositions, and in vitro antioxidant activities of *Chromolaena odorata* leaves. J Adv Pharm Technol Res. 2016;7(2):37-42.

- Podar R, Kulkarni GP, Dadu SS, Singh S, Singh SH. In vivo antimicrobial efficacy of 6% *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica*, and 3% sodium hypochlorite as root canal irrigants. *Eur J Dent.* 2015;9(4):529-34.
- Rajendra P. Settema, Ahmed Taher El-Hassana, Kiyonobu Honmaa, Graham P. Staffordb, Ashu Sharmaa. *Infect. Fusobacterium nucleatum and Tannerella forsythia Induce Synergistic Alveolar Bone Loss in a Mouse Periodontitis Model. Immun.* 2012;80(7):2436-2443.
- Ramírez Albores JE, Badano EI. Perspectiva histórica, sociocultural y ecológica de una invasión biológica: el caso del Pirúl (*Schinus molle* L., Anacardiaceae) en México. *Boletín de la Red Latinoamericana para el Estudio de Especies Invasoras* 2013;3(1)4-15.
- Ramírez LS, Marín Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 2009;15(42):263-268.
- Ramos Perfecto D, Moromi Nakata H, Martínez Cedillo E. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol Sanmarquina* 2011;14(1):34-38.
- Rodríguez Magaña M. Aislamiento y caracterización de compuestos derivados de plantas de la familia Juglandaceae con efecto antimicrobiano sobre *Mycobacterium tuberculosis*. 2011. Tesis.
- Rodríguez Magaña MP. Aislamiento y caracterización de compuestos derivados de plantas de la familia juglandaceae con efecto antimicrobiano sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis UANL. 2011

- Ruiz Montañez G, Ragazzo Sánchez JA, Calderón Santoyo M, Velázquez de la Cruz G, Ramírez de León JA, Navarro Ocaña A. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 2014;159:267–272.
- Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:536139.
- Salazar Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:536139.
- Salinas Gonzalez NR. Análisis de la actividad de extractos crudos de *Juglans regia* L, *Juglans mollis* y *Carya illinoensis* contra *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis UANL. 2004
- Sanchez Ruiz FH, Furuya Meguro AT, Arroniz Padilla S, Gomez Moreno A, Gomez L. Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y microcyn 60. *Rev Odont Mex.* 2009;12(1):9-16.
- Scandaliaris M, Fuentes E, Lovery RJ. Dos especies de Lamiáceas comercializadas en Córdoba (Argentina) bajo el nombre de "Peperina". *Multequina.* 2007;16(1):73-81.

- Shetty SB, Mahin-Syed-Ismail P, Varghese S, Thomas-George B, Kandathil-Thajuraj P, Baby D, Haleem S, Sreedhar S, Devang-Divakar D. Antimicrobial effects of Citrus sinensis peel extracts against dental caries bacteria: An in vitro study. J Clin Exp Dent. 2016 Feb 1;8(1):e71-7.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res. 2009;88(11):969-81.
- Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res. 2009;88:969–981.
- Siqueira JF, Rocas IN. Microbiología y tratamiento de las infecciones endodónticas. Vías de la pulpa. Cap. 15, ed. 10, editorial Helsevier. Pp:573-575
- Siqueira JF, Rôças IN. Microbiología y tratamiento de las infecciones endodónticas. Las vías de la pulpa. 2011. Cap 15. Décima Edición Ed. Elsevier. PP559-601
- Siqueira, Jr. JF, N. Rôças I. Microbiology and Treatment of Acute Apical Abscesses. Clin Microbiol Rev. Apr 2013; 26(2):255–273.
- Spoleti P. Valoracion de exitos y fracasos en endodoncia. Electronic Journal of Endodontics Rosario. 2005;04(2):1-9.
- Spratt DA, Pratten J, Wilson M. Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. International Endodontic Journal, 2001;34:300–307.
- Valera MC, Cardoso FG, Maekawa LE, Camargo CH, de Oliveira LD, Carvalho CA. In vitro antimicrobial and anti-endotoxin action of *Zingiber*

*Officinale* as auxiliary chemical and medicament combined to calcium hydroxide and chlorhexidine. *Acta odontol Scand.* 2015;73(7):556-61.

- Vera Rojas J, Benavides Garcia M, Moreno Silva E, Romero Viñas M. Conceptos y técnicas actuales en la irrigación endodóntica *Endodoncia* 2012;30(1):31-44.
- Vieira D , Amaral F, Maciel M, Nascimento F, Libério S,. Rodrigues V. *Journal of Ethnopharmacology* 2014;155(3);1441–1449.
- Vinothkumar TS, Rubin MI, Balaji L, Kandaswamy D. In vitro evaluation of five different herbal extract as an antimicrobial endodontic irrigant using real time quantitative polymerase chain reaction. *J Conserv Dent.* 2013;16:167
- Zamora Martinez M, Nieto de Pascual C . Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology.*1992;35(3):229–257.