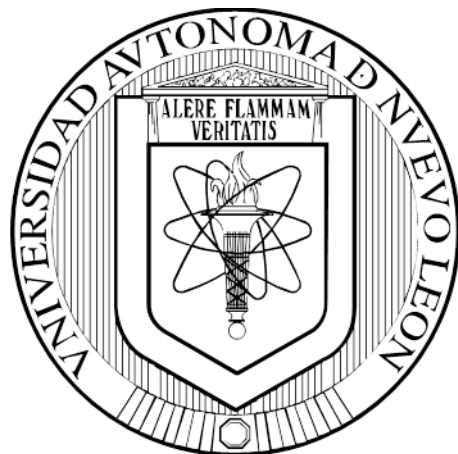


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VALORACIÓN BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis* PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA

POR

MCEP. OLIVIA ESCAMILLA GALLEGOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES**

JULIO, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



VALORACIÓN BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis*
PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA

COMITÉ DE TESIS

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Presidente

Dra. María Eufemia Morales Rubio
Secretario

Dra. Catalina Rivas Morales
Vocal

Dra. María Julia Verde Star
Vocal

Dra. Ma. Azucena Oranday Cárdenas
Vocal

CD. UNIVERSITARIA, SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.
JULIO 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



VALORACIÓN BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis*
PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA

Por:

OLIVIA ESCAMILLA GALLEGOS

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

DIRECCIÓN DE TESIS:

DR. SERGIO ARTURO GALINDO RODRÍGUEZ

Laboratorio de Nanotecnología
Facultad de Ciencias Biológicas, UANL
DIRECTOR

DRA. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN
Laboratorio de Química Analítica
Facultad de Medicina, UANL
DIRECTORA EXTERNA

**DRA. DRA. MYRIAM A. DE LA GARZA
RAMOS**

Facultad de Odontología, UANL
ASESORA EXTERNA

CD. UNIVERSITARIA, SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

JULIO 2018

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Institución a la que agradezco mi desarrollo profesional y a las Facultades de Ciencias Biológicas y de Odontología, donde se llevó a cabo el desarrollo de este proyecto.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 8315503 otorgada para la realización de los estudios de Doctorado.



Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP, 103.5/15/14156) por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.



Al Laboratorio de Nanotecnología de la FCB por las facilidades y todo el apoyo brindado en estos años.



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A los directores y asesores externos Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez, Dra. Rocío Álvarez Román, Dra. Myriam A. De La Garza Ramos, por su asesoría en este trabajo.

A mi comité de tesis Dra. María Eufemia Morales Rubio, Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. María Julia Verde Star y Dra. Ma. Azucena Oranday Cárdenas, por su participación y recomendaciones en este trabajo.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios de Química Analítica y Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas por apoyarme, darme sus consejos y siempre motivarme para continuar.

DEDICATORIAS

*Dedico esta tesis con todo mi cariño
a mi familia,
a mi esposo (qepd), a mis hijos y nietos*

*“Una meta es un faro.
Quien tiene una meta clara
jamás será alcanzado por
la noche de la indecisión”*

- Andrew Corentt

ÍNDICE GENERAL

SECCIÓN	CONTENIDO	PÁGINA
	ÍNDICE DE TABLAS	III
	ÍNDICE DE FIGURAS	IV
	LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	V
	RESUMEN	VI
	ABSTRACT	VI
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Anatomía de los tejidos periodontales	3
2.2	Placa dentobacteriana	5
2.3	Coagregación bacteriana	7
2.4	Respuesta del sistema inmune	9
2.5	Enfermedad periodontal	9
2.6	Clasificación de enfermedades periodontales	10
2.6.1	Gingivitis	11
2.6.2	Periodontitis	12
2.6.2.1	Crónica	12
2.6.2.2	Agresiva	13
2.7	Incidencia	13
2.8	Deterioro periodontal asociado con otros factores y enfermedades sistémicas	14
2.9	Tratamiento	15
2.9.1	Control mecánico	16
2.9.2	Control con antibióticos	16
2.9.3	Control con antisépticos	18
2.10	Clorhexidina	19
2.11	Importancia de plantas y productos naturales en la salud oral	21
2.11.1	Aceites esenciales en Odontología	21
2.11.2	Aceite esencial de eucalipto	22
3	JUSTIFICACIÓN	28
4	HIPÓTESIS	39
5	OBJETIVOS	30
5.1	Objetivo general	30
5.2	Objetivos particulares	30
6	MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1	Material vegetal	31
6.1.1	Obtención del aceite esencial	31
6.1.2	Caracterización por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) y por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama (CG-FID)	31

6.2	Determinación del efecto antiproliferativo de los aceites esenciales en <i>Streptococcus gordonii</i>	32
6.3	Determinación de capacidad antioxidante de los aceites esenciales por la técnica de captación de radical DPPH	33
6.4	Determinación de polifenoles totales en los aceites esenciales	33
6.5	Determinación de flavonoides totales en los aceites esenciales	34
6.6	Determinación del efecto antiinflamatorio <i>in vitro</i> con albúmina sérica bovina	34
6.7	Efecto de los aceites esenciales en la expresión génica de citocinas proinflamatorias en monocitos de sangre periférica	35
6.8	Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> por hemólisis eritrocitaria inducida	36
6.9	Determinación de toxicidad por bioensayo con <i>Artemia salina</i>	37
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1	Caracterización química de los aceites esenciales	38
7.2	Determinación del efecto anti-proliferativo de los aceites esenciales en <i>Streptococcus gordonii</i>	42
7.3	Determinación de capacidad antioxidante de los aceites esenciales por la técnica de captación de radical DPPH	44
7.4	Determinación de polifenoles totales en los aceites esenciales	45
7.5	Determinación de flavonoides totales en los aceites esenciales	47
7.6	Determinación del efecto antiinflamatorio <i>in vitro</i> con albúmina sérica bovina	47
7.7	Evaluación del efecto de los aceites esenciales en la expresión génica de citocinas proinflamatorias en monocitos de sangre periférica	49
7.8	Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> por hemólisis eritrocitaria inducida	52
7.9	Determinación de toxicidad por bioensayo con <i>Artemia salina</i>	53
8	CONCLUSIONES	56
9	PERSPECTIVAS	57
10	BIBLIOGRAFÍA	58
11	RESUMEN BIOGRÁFICO	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	PÁGINA
I	Clasificación de las enfermedades y lesiones periodontales según la <i>American Academy of Periodontology</i> (Hinrichs <i>et al.</i> , 2014).	11
II	Características presentes en la periodontitis agresiva (Martínez, 2016).	14
III	Efectos adversos de antibióticos usados en el tratamiento de periodontis (Mombelli, 2011).	18
IV	Componentes del aceite esencial de la hoja de <i>E. tereticornis</i> .	40
V	Componentes del aceite esencial del fruto de <i>E. tereticornis</i>	42
VI	Determinación de polifenoles ¹ y flavonoides totales ² para los aceites esenciales de <i>E. tereticornis</i> (\bar{x} \pm DS; n=3).	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Componentes del periodonto.	3
2	Asociación entre las especies microbianas subgingivales.	7
3	Formación inicial de la placa. Los primeros colonizadores se unen a los receptores en la película.	8
4	Cromatogramas del aceite esencial de la hoja de <i>E. tereticornis</i> obtenidos por A) Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-M) y B) Cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID).	39
5	Cromatogramas del aceite esencial del fruto de <i>E. tereticornis</i> obtenidos por A) Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-M) y B) Cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID).	41
6	Inhibición de la proliferación de <i>S. gordonii</i> de AE de hoja y AE de fruto de <i>E. tereticornis</i> por el método de micro dilución. (\bar{x}) \pm DS, n = 3).	43
7	Comparación del porcentaje de inhibición (%INHI) del radical DPPH del AE de hoja y AE de fruto de eucalipto y carvacrol como antioxidante de referencia (control). (\bar{x}) \pm DS, n = 3).	44
8	Determinación del efecto antiinflamatorio sobre BSA <i>in vitro</i> para los aceites esenciales obtenidos a partir de <i>E. tereticornis</i> (\bar{x}) \pm DS, n = 3).	48
9	Efecto de AEh y AEf de <i>E. tereticornis</i> en la expresión del gen que codifica para A) IL-8; B) IL-1 β ; C) TNF- α . LPS (lipopolisacárido a 10 μ g/mL), H30 (AEh a 30 μ g/mL), H50 (AEh a 50 μ g/mL), H100 (AEh a 100 μ g/mL), H150 (AEh a 150 μ g/mL), F30 (AEf a 30 μ g/mL), F50 (AEf a 50 μ g/mL), F100 (AEf a 100 μ g/mL), F150 (AEf a 150 μ g/mL). (\bar{x}) \pm DS, n = 3).	51
10	Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> por hemólisis inducida de eritrocitos para los aceites esenciales obtenidos a partir de <i>E. tereticornis</i> (\bar{x}) \pm DS, n = 3).	53
11	Determinación de CL ₅₀ por bioensayo con <i>Artemia salina</i> para los aceites esenciales obtenidos a partir de <i>E. tereticornis</i> .	54

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AE	Aceite esencial
A Eh	Aceite esencial de hojas de <i>Eucalyptus tereticornis</i>
A Ef	Aceite esencial de fruto de <i>Eucalyptus tereticornis</i>
CHX	Clorhexidina
UFC	Unidades formadoras de colonia
DO	Densidad Óptica

RESUMEN

Las enfermedades periodontales (EP) son un conjunto de infecciones localizadas en las encías y estructuras de soporte del diente. El desarrollo de la placa dentobacteriana es uno de los principales factores etiológicos de estas enfermedades. El control químico de la placa bacteriana es una práctica que se usa de manera complementaria a un control mecánico ineficaz. Los fármacos más utilizados para tal fin son los antisépticos bucodentales, la clorhexidina (CHX) destaca como el más eficiente. Sin embargo, presenta efectos adversos, como pigmentación marrón de los dientes y de materiales de restauración, alteración del gusto y lesiones descamativas en la mucosa. El empleo de productos naturales representa una alternativa para sustituirla. Se ha reportado que los aceites esenciales (AE), como el del eucalipto, presentan actividades antimicrobianas y antioxidantes que podrían ser aprovechadas en los tratamientos odontológicos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial del AE de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*) para ser usado como coadyuvante en la prevención y tratamiento de enfermedades periodontales. Los aceites obtenidos por hidrodestilación, de las hojas (AEh) y de los frutos (AEf), fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas y por cromatografía de gases FID. Los componentes mayoritarios en el AEh fueron α - y β -felandreno, β -cariofileno, 1,8-cineol y biciclogermacreno, mientras que en el AEf fueron o-cimeno, β -felandreno y óxido de cariofileno. A concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$, el AEh presentó respectivamente inhibiciones de 84 y 96% sobre *Streptococcus gordonii*; mientras que, el AEf mostró inhibición de 55% a las concentraciones antes mencionadas. La actividad antioxidante evaluada por medio de la técnica de DPPH, no fue relevante en ambos extractos. Utilizando un ensayo *in vitro* con albúmina sérica, ambos AE mostraron un efecto antiinflamatorio a concentraciones entre 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$, dicho efecto fue confirmado al evaluar la expresión génica de citocinas proinflamatorias en monocitos de sangre periférica, encontrándose que los dos AE inhibían la producción de mediadores proinflamatorios (TNF- α e IL-1 β). La citotoxicidad evaluada con el ensayo de inducción de hemólisis fue de 50% a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ para los dos aceites. En el ensayo con *Artemia salina* ambos AE mostraron una CL₅₀ menor a 17 $\mu\text{g/mL}$. En conclusión, se pudo demostrar que el aceite esencial de *E. tereticornis* presenta potencial para ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades periodontales, destacándose su actividad antiinflamatoria, y en menor medida, sus actividades antioxidante y antimicrobiana.

ABSTRACT

Periodontal infections are a group of diseases located in the gums and tooth support structures. The control of bacterial film is the main method in the prevention of periodontal diseases. Complementary to an inefficient mechanical control, the chemical control of bacterial film is frequently used. The most used drugs for this purpose are oral antiseptics, among them chlorhexidine (CHX) has been widely accepted as the most effective. However, CHX has several side effects such as a brown pigmentation of teeth and restoration materials, a taste disturbance and desquamative lesions. Then, the use of natural products is an interesting alternative to replace the conventional antiseptics. Because of their antimicrobial and antioxidant properties, essential oils (EO) have been proposed to be used in periodontal treatments. This study was then focused on evaluation of biological activities of eucalyptus EO (*Eucalyptus tereticornis*) to assess its potential as adjuvant in periodontal treatments. First, eucalyptus EO was obtained by hydrodistillation from leaf (EOl) and fruit (EOf) of *E. tereticornis*. Both EO were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectroscopy and Gas Chromatography for FID. Main components in EOl were α - and β -phelandrene, β -caryophyllene, 1,8-cineol y biciclogermacrene, while for EOf main components were o-cimeno, β -phelandreno and caryophyllene oxide. The antimicrobial activities of EO were evaluated against the periodontal pathogen *Streptococcus gordonii*. Concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ from the AEl inhibited 84 and 96%, respectively, the proliferative activity of the pathogen; while the AEf did not show percentages of effectiveness greater than 55% at the same concentrations. The antioxidant activity was also evaluated by the DPPH technique. A weak antioxidant capacity was determined for the eucalyptus EO. Further, the anti-inflammatory activity was evaluated. Using an *in vitro* assay with serum albumin, both AE showed an anti-inflammatory effect at concentrations between 25 and 100 $\mu\text{g/mL}$. Additionally, this effect was confirmed when evaluating the gene expression of proinflammatory cytokines in peripheral blood monocytes, finding that both AE inhibited the production of proinflammatory mediators (TNF- α and IL-1 β). Finally, an evaluation of the cytotoxicity of the AE was carried out. Induction of hemolysis of red blood cells test showed 50% hemolysis to concentrations equal or greater than 150 $\mu\text{g/mL}$. However, results from an assay with brine shrimp showed a LC₅₀ less to 17 $\mu\text{g/mL}$ in both oils. Results showed that *E. tereticornis* EO can have a potential use as adjuvant for periodontal treatments, mainly as anti-inflammatory agent and less as antimicrobial or antihemolytic one.

1 INTRODUCCIÓN

La caries y la enfermedad periodontal son las enfermedades bucales más comunes que afectan a la población mundial. En particular, las enfermedades periodontales son infecciones crónicas que conllevan a la destrucción del aparato de soporte, incluyendo la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Estas enfermedades inician con la acumulación local de bacterias sobre el diente. Las enfermedades periodontales pueden afectar a uno o varios dientes, y si no se tratan pueden ocasionar la pérdida de los mismos, particularmente en adultos. Esta es la patología odontológica más común en adultos como también una de las enfermedades inflamatorias crónicas más comunes que afectan a la gran mayoría de la población mundial. De acuerdo con la OMS, alrededor del 15% de los adultos en todo el mundo tienen enfermedad periodontal avanzada (profundidad de bolsa de 6 mm o más). No obstante, otros estudios indican que las enfermedades periodontales afectan al 48% de la población adulta. Las terapias periodontales, tienen un efecto benéfico en términos de alentar o detener la progresión de la enfermedad periodontal y mantener el periodonto. Particularmente, las terapias antimicrobianas pueden agruparse en 3 categorías: 1) aquellas que físicamente remueven microorganismos, frecuentemente llamadas desbridamiento mecánico, 2) aquellas que intentan matar o afectar el metabolismo del organismo, tales como los antisépticos y antibióticos, y por último, 3) las que afectan el ambiente de los organismos.

Existen múltiples fármacos utilizados en el control de placa, entre ellos destacan los antibióticos (como la penicilina, vancomicina y kanamicina), los antisépticos bisguanídicos como la clorhexidina, alexidina y octenidina y compuestos de amonio cuaternario y fluoruros. Sin embargo, los antibióticos pueden ocasionar efectos adversos en el paciente, los cuales van desde disnea y alteración al gusto, hasta diarrea y daño hepatocelular. En el caso de la CHX, considerada como el mejor antiséptico bucal, su uso prolongado en boca incluye efectos adversos tales como pigmentación marrón de los dientes y de materiales de restauración, alteración del gusto y lesiones descamativas en la mucosa. Además, se ha asociado el uso de biocidas como la clorhexidina y el triclosán como posibles causas de la selección y persistencia de cepas bacterianas con bajo nivel de resistencia a los antibióticos.

Por lo anterior, recientemente, se ha estudiado el uso de productos naturales como posibles alternativas para mejorar la efectividad de los tratamientos contra las enfermedades periodontales. Una opción viable es el uso de aceites esenciales, los cuales son una mezcla compleja de compuestos aromáticos de bajo peso molecular, extraídos a partir de material vegetal (flores, semillas, hojas o frutos). Entre las ventajas que presentan los aceites esenciales sobre la clorhexidina, tenemos que, no producen pigmentación en los dientes, no alteran la percepción del gusto, no promueven la formación de cálculos y su eficacia no disminuye con la presencia de pastas dentales. En particular, el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*) presenta características como agente promisorio para el tratamiento de las enfermedades periodontales, debido a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y expectorantes principalmente.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo se orientó a evaluar biológicamente el potencial del aceite esencial de *E. tereticornis* como candidato a coadyuvante en la prevención y el tratamiento de enfermedades periodontales. En el presente trabajo se describe la forma de obtención, caracterización e identificación de aceites esenciales de *E. tereticornis* a partir de la hoja y el fruto de la planta. Posteriormente, se presentan los análisis realizados para la evaluación de sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes. Finalmente, se presentan dos ensayos de toxicidad utilizando una prueba de citotoxicidad directamente con eritrocitos y una prueba de toxicidad por medio de un ensayo con *Artemia salina*.

2 ANTECEDENTES

Se le llama periodonto a los tejidos que rodean y alojan a los dientes en los maxilares. Sus principales funciones incluyen proveer de protección a los dientes y proporcionar la fuerza para la masticación. Esta estructura abarca dos tejidos blandos que son la encía y el ligamento periodontal, y dos tejidos duros que son el cemento y el hueso alveolar (Figura 1). También llamado aparato de inserción o tejido sostén de los dientes, constituye una unidad de desarrollo biológica y funcional que experimenta determinados cambios con la edad y que además está sometido a modificaciones morfológicas relacionadas con alteraciones funcionales y del medio ambiente bucal (Vargas *et al.*, 2016).

2.1 Anatomía de los tejidos periodontales

La encía es la parte de la mucosa bucal que cubre el hueso alveolar y rodea los cuellos de los dientes. Anatómicamente se divide en las áreas marginal, insertada e interdental, las cuales están estructuradas para funcionar específicamente contra daños mecánicos y microbianos. La encía marginal es el extremo terminal que rodea a los dientes a manera de collar. El margen gingival libre es a menudo redondeado, de modo que se forma una pequeña hendidura o surco entre el diente y la encía (Fiorellini *et al.*, 2014a). La encía adherida se extiende en sentido apical hasta la unión mucogingival y se encuentra adherida firmemente, por fibras del tejido conjuntivo, al hueso alveolar subyacente y al cemento (Lindhe *et al.*, 2011).

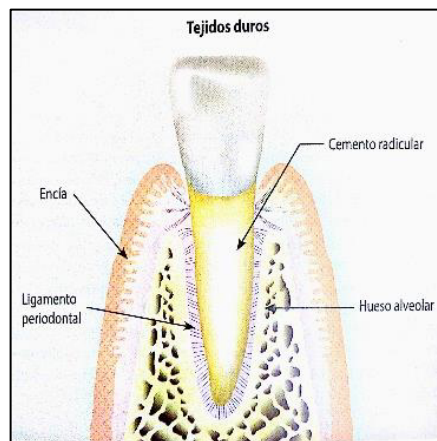


Figura 1.- Componentes del periodonto.

La formación de la encía marginal da origen a un pequeño surco entre el tejido gingival y el diente llamado surco gingival. Cualquier profundidad del surco mayor de 3 mm se considera patológica y puede representar un aumento de la encía o la presencia de una bolsa periodontal. El surco contiene un fluido llamado fluido cervicular gingival, el cual es un transudado que se filtra continuamente desde el tejido subepitelial hacia el surco gingival (Vargas *et al.*, 2016).

En cuanto al epitelio gingival, su función principal es proteger las estructuras profundas, permitiendo un intercambio selectivo con el medio ambiente bucal. Consiste en un revestimiento continuo de epitelio escamoso estratificado. Se le pueden identificar 3 áreas desde los puntos morfológico y funcional: epitelio bucal o externo, del surco y de unión. Los queratinocitos (células productoras de queratina) son el principal tipo de célula epitelial gingival y constituyen alrededor del 90% de la población celular total del epitelio bucal, el cual también contiene: melanocitos, células de Lagerhans, células de Merkel y células inflamatorias (linfocitos). Estas últimas reaccionan con los antígenos en el proceso de penetración del epitelio. En consecuencia, se inicia una respuesta inflamatoria temprana que inhibe o impide la penetración adicional de antígenos en el tejido. Por su parte, las células de Merkel presentan función sensitiva (Lindhe *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2016).

Por otro lado, en el tejido conjuntivo gingival el elemento celular preponderante es el fibroblasto, principalmente, porque juega un papel importante en el desarrollo, mantenimiento y reparación de este tejido. Desde el punto de vista clínico, en la encía normal se encuentran pequeños focos de células plasmáticas y, también linfocitos cerca de la base del surco. En la enfermedad periodontal, los neutrófilos pueden verse en un número relativamente elevado tanto en el tejido conjuntivo gingival, como en el surco. Estas células inflamatorias generalmente están presentes en pequeñas cantidades en la encía. De manera contraria, los linfocitos están prácticamente constantes en la encía sana, incluso antes de una erupción dental (Fiorellini *et al.*, 2014a).

El ligamento periodontal se compone de un complejo vascular y tejido conjuntivo que rodea la raíz del diente y que lo conecta a la pared interna del hueso alveolar. Es la continuación con el tejido conjuntivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los canales

vasculares del hueso. El espacio del ligamento periodontal disminuye alrededor de los dientes que no están en función y en dientes no erupcionados, pero aumenta en dientes sometidos a hiperfunción. Las células del ligamento periodontal participan en la formación y reabsorción del cemento y hueso, que ocurre en el movimiento dentario fisiológico. Además, aporta nutrientes al cemento, hueso y encía por medio de vasos sanguíneos y provee drenaje linfático (Fiorellini *et al.*, 2014a).

El cemento es el tejido mesenquimal calcificado y avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica. Se divide en dos tipos: acelular y celular. Ambos tienen una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas de colágeno (Fiorellini *et al.*, 2014a). El cemento cumple diferentes funciones. En él se insertan las fibras del ligamento periodontal y contribuye al proceso de reparación cuando la superficie radicular ha sido dañada (Lindhe *et al.*, 2011). El cemento acelular y el cemento celular se organizan en laminillas separadas por líneas incrementales paralelas al eje longitudinal de la raíz.

La apófisis alveolar se define como la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes. La apófisis alveolar está compuesta por hueso que se forma tanto por células del folículo o saco dentario (hueso alveolar propiamente dicho) como por células que son independientes del desarrollo dentario (Lindhe *et al.*, 2011). El hueso alveolar se forma conjuntamente durante el desarrollo y erupción de los dientes y se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden (Vargas *et al.*, 2016).

2.2 Placa dentobacteriana

La placa dentobacteriana se define clínicamente como una sustancia estructurada, resistente, de color amarillo grisáceo que se adhiere a una superficie sólida, en la boca. A través de esta placa las bacterias pueden unirse a una amplia variedad de superficies, incluyendo a los tejidos blandos orales, los dientes y a otras bacterias. El número de bacterias en la placa dentobacteriana supragingival en una sola superficie dental llega a exceder los 10^9 UFC (Teughels *et al.*, 2014). En general, los componentes de la placa dentobacteriana son: 1) microcolonias, 2) matriz

intermicrobiana y 3) canales, a través de éstos últimos es por donde fluyen los nutrientes y agua que las bacterias aprovechan para, posteriormente, utilizarlos y reproducirse (Díaz, 2016).

El término biopelícula describe a la comunidad microbiana asociada con una superficie dentaria o con cualquier otro material duro no descamativo. La microflora oral residente consiste en una gran diversidad de microorganismos, incluyendo virus, bacterias, hongos, microplasmas y, en algunos casos, protozoarios. Las bacterias representan el componente principal de la microflora oral, se estima que incluye arriba de 500 especies bacterianas. Sin embargo, la mayoría de las bacterias bucales son comensales inofensivas, bajo condiciones normales (Teughels *et al.*, 2014).

Las biopelículas se componen de microcolonias de células bacterianas, con mayor frecuencia de varias especies, que no están distribuidas al azar en una matriz conformada o glicocálix. Los exopolisacáridos, los cuales son producidos por las bacterias en la biopelícula, son los principales componentes de ésta (un 50-95% peso seco) y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la biopelícula, confirmando otras propiedades beneficiosas. Las bacterias pueden producir varios polisacáridos diferentes dependiendo de su estado fisiológico y de la presencia de sustratos específicos. Los exopolisacáridos ayudan en la protección de las células microbianas dentro de la biopelícula, al evitar la desecación y el ataque de agentes nocivos; además, pueden actuar como un amortiguador y ayudar a retener enzimas extracelulares (y sus sustratos), así como a mejorar la utilización de sustratos por las células bacterianas (González, 2016).

La biopelícula oral representa el principal agente etiológico de la caries y de las enfermedades periodontales. Tres especies, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus*, han sido fuertemente asociadas con el estado de la enfermedad periodontal y de su progresión. Muchas especies bacterianas poseen superficies estructurales, tales como fimbrias y fimbriillas que ayudan a su adhesión a diferentes superficies. Algunas fimbrias también transportan adhesinas implicadas en la formación de estructuras de capas múltiples (González, 2016). Seis grupos de especies bacterianas han sido estrechamente asociados en la biopelícula oral (Figura 2). Estos incluyen *Actinomyces*, *Streptococcus*

(complejos de color amarillo), *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter concisus* (complejos de color verde), *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus* (complejos de color morado). Estos grupos de especies son los primeros colonizadores de la superficie dental y su crecimiento, por lo general, precede a la multiplicación de los complejos de color naranja y rojo, predominantemente Gram negativos (Socransky y Haffajee, 2002).



Figura 2.- Asociación entre las especies microbianas subgingivales.

En particular, las enfermedades periodontales son causadas por un grupo relativamente definido de patógenos periodontales que actúan solos o en combinación. Estas especies incluyen *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptoestreptococcus micros*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y una especie de *Tannerella* (Socransky & Haffajee, 2011).

2.3 Coagregación bacteriana

La mayoría de las bacterias orales humanas se adhieren a otras bacterias orales. Esta adherencia de célula a célula se conoce como coagregación. La placa supragingival es la película adquirida que se forma sobre una superficie de un diente limpio. Inicialmente, algunas moléculas son adsorbidas a la superficie dental segundos después de la limpieza. Estas moléculas son

derivadas principalmente de la saliva, mientras que en la región subgingival provienen del fluido crevicular. Esto forma una película condicionante que altera las propiedades de la superficie dental, así las bacterias interactúan directamente de manera reversible e irreversible con las moléculas que la constituyen. En segunda instancia, los colonizadores secundarios se adhieren mediante sus adhesinas a los receptores en las bacterias previamente adheridas, incrementando la diversidad microbiana dentro de la biopelícula en desarrollo. Más tarde, las bacterias adheridas se multiplican incrementando la síntesis de exopolímeros para formar la matriz de la biopelícula (Figura 3). La estructura química de esta matriz puede excluir o restringir la penetración de otras moléculas como las de agentes antimicrobianos, incluyendo a la clorhexidina (Brieder *et al.*, 2011; Xue-Dong & Wen-Yuan, 2010).

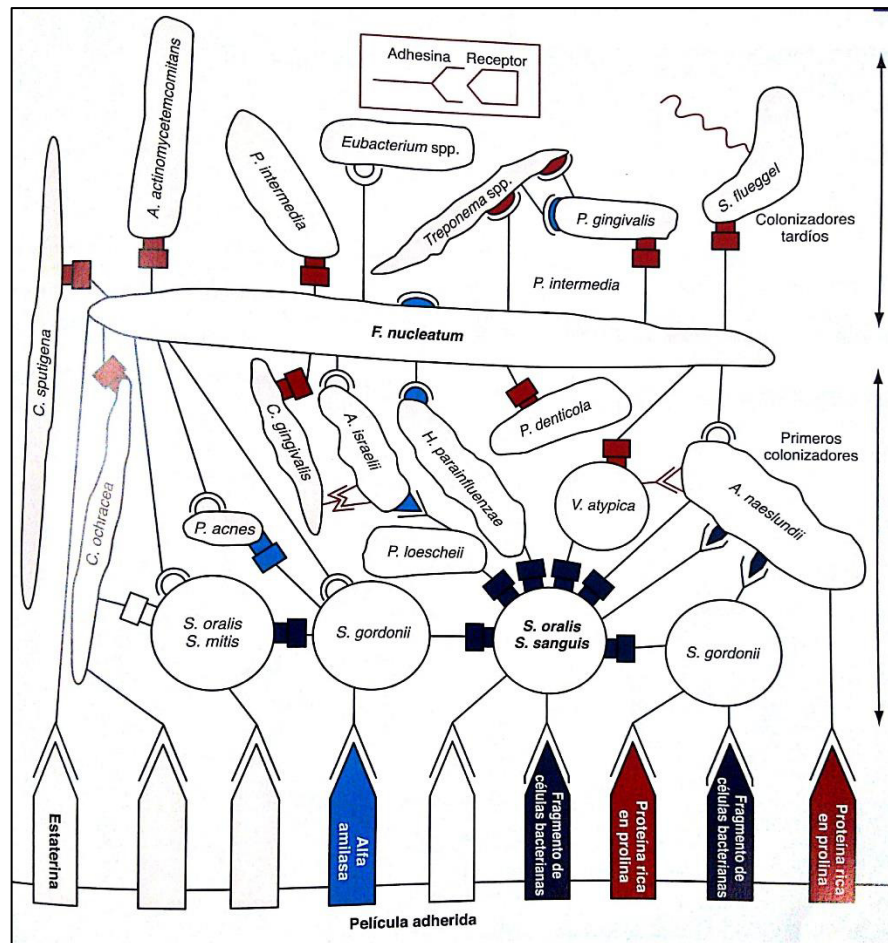


Figura 3.- Formación inicial de la placa. Los primeros colonizadores se unen a los receptores en la película.

Los estreptococos componen el 47-82% de la microbiota que coloniza la superficie de un diente limpio. La mayoría de los *Streptococcus viridians* se adhieren a la hidroxiapatita recubierta de saliva, también ciertas cepas de *S. gordonii*. A diferencia de otras especies orales, ambos muestran un alto grado de coagregación entre las cepas, por lo que participan como los colonizadores primarios. Las especies Gram-negativas, más prominentes numéricamente en la biopelícula dental en una etapa posterior, están dominadas por *Fusobacterium nucleatum*. Esta especie coagrega con todas las bacterias orales ensayadas hasta ahora *in vitro*, incluyendo cepas de *P. gingivalis*, *Treponema denticola* y *A. actinomycetemcomitans*, entre otras (Socransky & Haffajee, 2002; Teughels *et al.*, 2014).

2.4 Respuesta del sistema inmune

Los factores sistémicos que afectan la función de neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos modifican la producción o la actividad de los mediadores inflamatorios del huésped. Estas alteraciones pueden manifestarse clínicamente como una alteración temprana de destrucción periodontal o un índice más rápido de destrucción del que se daría en ausencia de esos trastornos (Mealey *et al.*, 2014).

Los productos de las bacterias periodontopatógenas, en especial los lipopolisacáridos (LPS), retan al sistema inmune del huésped y generan una respuesta inmune inflamatoria, tanto específica, como inespecífica. En esta respuesta el aumento de las citoquinas proinflamatorias (Il1 α , Il6, y el TNF α) es importante para activar el sistema inmune y el control de la infección (Socransky & Haffajee, 2002).

2.5 Enfermedad periodontal

La caries y la enfermedad periodontal son las enfermedades bucales más comunes que afectan a la población mundial. En particular, las enfermedades periodontales son infecciones crónicas que conllevan a la destrucción del aparato de soporte, incluyendo la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Estas enfermedades inician con la acumulación local de bacterias sobre el diente. Las enfermedades periodontales pueden afectar a uno o varios dientes,

y si no se tratan pueden ocasionar la pérdida de los mismos, particularmente en adultos. De hecho, esta patología odontológica no solo es la más común en adultos, sino que es una de las enfermedades inflamatorias crónicas más comunes que afectan a la gran mayoría de la población mundial (Gu & Ryan, 2010).

Aunque la biopelícula es esencial para el inicio de las enfermedades periodontales, la mayoría de los procesos destructivos asociados con estas enfermedades se debe a una respuesta excesiva del huésped al reto bacteriano. La placa dentobacteriana se va depositando en la superficie de las piezas dentales y dentro del surco periodontal debido a una mala higiene bucal, si no se elimina comienza la gingivitis. Posteriormente, la gingivitis al no tratarse se convierte en periodontitis (Gu & Ryan, 2010).

).

2.6 Clasificación de enfermedades periodontales

En particular, el sistema de clasificación de las enfermedades periodontales, desarrollado por la Asociación Dental Americana se basa en la severidad de la pérdida de inserción. El clínico usa información clínica y radiográfica obtenida y clasifica al paciente dentro de cuatro tipos:

- Tipo I: Gingivitis.
- Tipo II: Periodontitis leve.
- Tipo III: Periodontitis moderada.
- Tipo IV: Periodontitis avanzada.

La clasificación que se sigue aquí está basada en las opiniones más aceptadas, consensuadas internacionalmente, de las enfermedades que afectan al periodonto y que se presentaron y analizaron en el *International Periodontal Workshop for the Clasiffication of the Periodontal Diseases* en 1999 (Hinrichs *et al.*, 2014). En la Tabla I se presenta la clasificación de las enfermedades periodontales en base a la *American Academy of Periodontology*.

Tabla I. Clasificación de las enfermedades y lesiones periodontales según la *American Academy of Periodontology* (Hinrichs *et al.*, 2014).

Padecimiento	Tipos
Enfermedades de las encías	Enfermedades gingivales inducidas por placa Lesiones gingivales no inducidas por placa
Periodontitis crónica	Localizada Generalizada
Periodontitis agresiva	Localizada Generalizada
Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas	Enfermedades periodontales necrotizantes Abscesos del periodonto Periodontitis asociada a lesiones endodónticas
Malformaciones y lesiones congénitas o adquiridas	Deformidades mucogingivales Lesiones de rebordes edéntulos Trauma oclusal

2.6.1 *Gingivitis*

Es la inflamación de la encía e inicia con patógenos bucales invasivos específicos que colonizan la biopelícula de la placa dentobacteriana en la superficie radicular del diente. Los cambios patológicos de la gingivitis se relacionan con la presencia de microorganismos bucales insertados en el diente y quizás en el surco gingival o cerca de él. Estos microorganismos pueden sintetizar productos que producen daño a las células epiteliales y del tejido conjuntivo. El ensanchamiento resultante de los espacios entre las células del epitelio de unión durante la gingivitis temprana permite que agentes nocivos derivados de las bacterias o que las propias bacterias, puedan entrar en el tejido conjuntivo (Fiorellini *et al.*, 2014b).

Los productos microbianos activan a monocitos/macrófagos para que produzcan sustancias vasoactivas como prostaglandinas, E₂ (PGE₂), interferón (IFN), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). Además, IL-1 β alteran las propiedades de los fibroblastos gingivales retrasando su muerte a través de un mecanismo que bloquea la apoptosis, el cual estabiliza la población de fibroblastos gingivales en la inflamación (Fiorellini *et al.*, 2014b).

Casi todas las biopsias de encía humana clínicamente normal contienen células inflamatorias en las que predominan las T, con muy pocas células B o plasmáticas. Estas células no generan daño en el tejido, pero parecen ser importantes en la respuesta diaria del huésped ante las

bacterias y otras sustancias a las que se expone la encía. Por tanto, bajo condiciones normales, hay un flujo constante de neutrófilos que migran de los vasos del plexo gingival a través del epitelio de unión, y hacia adentro del surco gingival y la cavidad oral (Fiorellini *et al.*, 2014b).

Las fases agudas y crónicas de la inflamación no son fácilmente aplicables en la enfermedad periodontal, porque en la encía clínicamente sana ya existe una lesión pequeña que simula una inflamación aguda (Monteagudo, 2016). En distintas etapas de la gingivitis existen diferentes hallazgos clínicos. En la lesión inicial, a partir de la dilatación vascular, se manifiesta flujo de líquido gingival. En la lesión temprana hay proliferación vascular y se ve hemorragia al sondeo. Finalmente, en la lesión establecida ya se aprecian cambios en color, tamaño y textura de la encía (Fiorellini *et al.*, 2014b).

2.6.2 Periodontitis

Es un proceso infeccioso de la encía y del aparato de inserción adyacente, la cual es producida por diversos microorganismos que colonizan el área supra y subgingival. Esta enfermedad tiene como principal manifestación una pérdida estructural del aparato de inserción del diente, provocando su caída (Díaz, 2016).

2.6.2.1 Crónica

Se define a la periodontitis crónica como la enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte dental, es sitio-específica y causada por microorganismos específicos: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Treponema denticola*, *Streptococcus intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* y *Eikenella corrodens*. Inicia como gingivitis inducida por placa dentobacteriana, presentando pérdida de inserción detectable clínicamente durante periodos de remisión y exacerbación. Es la forma más común de periodontitis, prevalente en adultos, pero puede presentarse en niños. Presenta una relación entre el grado de destrucción y los factores contribuyentes, es común detectar cálculo subgingival (Martínez, 2016).

La placa dentobacteriana que desencadena la periodontitis crónica presenta especies indígenas de la microbiota oral. La progresión de las enfermedades periodontales es afectada por la efectividad de los hábitos de higiene oral, acceso al cuidado dental profesional, susceptibilidad genéticamente controlada, ciertas enfermedades sistémicas (como diabetes mellitus) y otros poderosos modificadores de la respuesta del huésped como el tabaquismo (Martínez, 2016).

2.6.2.2 Agresiva

Es una enfermedad periodontal destructiva que se desarrolla en etapas tempranas de la vida. Hay indicaciones de que los factores sistémicos pueden jugar un papel importante en la etiología de la periodontitis agresiva, más que en la forma crónica. Otras formas agresivas de enfermedades periodontales son usualmente encontradas en pacientes que están afectados con ciertas enfermedades sistémicas (Martínez, 2016).

Se ha planteado la hipótesis de que los herpesvirus, incluido el virus del Epstein-Barr y los citomegalovirus, pueden afectar las defensas locales del hospedero, y por lo tanto incrementar la agresividad de bacterias periodontopatógenas contribuyendo a la etiología de la periodontitis agresiva (Martínez, 2016). Los pacientes diagnosticados con periodontitis agresiva presentan una serie de características en común (Tabla II).

2.7 Incidencia

La enfermedad periodontal es considerada la segunda de las dos enfermedades bucales con mayor prevalencia en la población mundial que afecta la cavidad bucal del ser humano. De acuerdo con la OMS (2012), las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de los dientes, afectan a un 15-20 % de los adultos de edad media (35-44 años). Sin embargo, algunos autores estiman que las enfermedades periodontales pueden llegar a afectar hasta el 48% de la población adulta (Villa, 2015).

Tabla II. Características presentes en la periodontitis agresiva (Martínez, 2016).

Principales hallazgos	Hallazgos secundarios
Sistémicamente sano	Cantidad de depósitos microbianos inconsistentes con la destrucción de los tejidos periodontales
Rápida pérdida de inserción y destrucción ósea	Elevada proporción de <i>A. actinomycetemcomitans</i> y en algunas poblaciones <i>P. gingivalis</i>
Agregación familiar	Anormalidades en los fagocitos Híper respuesta de algunos fenotipos de macrófagos, elevados niveles de PGE ₂ E IL-1β La progresión de pérdida de inserción y ósea puede auto limitarse

En México un alto porcentaje de la población carece de los servicios básicos de salud, por ese motivo, la salud oral no es percibida como una necesidad básica para la gran mayoría de los mexicanos. A nivel nacional la tendencia al 2011 fueron 658,412 casos de gingivitis con una incidencia del 602.83 por 100,000 habitantes, con lo que ocupó el segundo lugar de las veinte principales causas de enfermedades no transmisibles (Villa, 2015).

En datos más recientes, informe 2015 del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB, 2015), se reportaron los resultados sobre el Índice Periodóntico Comunitario (IPC) de 115,248 pacientes incidentes de los servicios de salud de primer nivel. Aproximadamente, 56.8 % tenían algún signo de enfermedad periodontal, un poco más de la quinta parte (21.1 %) tenían gingivitis, 3.9 % signos de enfermedad periodontal leve y 0.8 % signos de enfermedad periodontal avanzada (SIVEPAB, 2015).

2.8 Deterioro periodontal asociado con otros factores y enfermedades sistémicas

La periodontitis ha sido implicada como un factor de riesgo potencial para las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, diabetes, parto pretérmino, bajo peso al nacer y enfermedad renal (Claffey *et al.*, 2010; Philstrom *et al.*, 2005).

La salud bucal puede verse comprometida por diversos factores naturales y patológicos que suceden a lo largo de la vida de un ser humano. Por ejemplo, la caries y periodontitis son infecciones bacterianas que aceleran su progresión durante la gestación. Las alteraciones en la

composición salival, disminución del pH salival y de su capacidad amortiguadora y los cambios de la flora bucal son algunos factores que se alteran durante el embarazo y que pueden favorecer las enfermedades en la cavidad oral (Herane, 2014).

Asimismo, la prevalencia de la enfermedad periodontal es significativamente mayor en la etapa posmenopáusicas que en la premenopáusicas. El desequilibrio entre la formación y reabsorción ósea creado por el déficit estrogénico podría manifestarse tempranamente en la estructura alveolar al crear volumen negativo de hueso, lo cual aumenta el riesgo de enfermedad periodontal y de la pérdida dental (Aguilar *et al.*, 2014).

Factores extrínsecos como el estrés se han incluido como un factor de riesgo en la enfermedad periodontal. El diagnóstico de conducta de estrés manifestado por llanto, preocupaciones, cambio de humor, aumento en la ingesta de café, impaciencia, dolores de cuello y hombro y de la mano con una enfermedad periodontal entre moderada y avanzada (Petrelli *et al.*, 2003).

Las enfermedades sistémicas también influyen en el estado de salud del periodonto. La diabetes mellitus constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad periodontal y a su vez, esta última puede poseer efectos negativos sobre los valores de la glucemia. Las formas más graves de enfermedad periodontal se han asociado a niveles elevados de productos de glucosilación avanzada (Fajardo *et al.*, 2016; Villa, 2015).

Además, se ha concluido que la periodontitis no tratada está asociada con alteraciones del metabolismo de lípidos. Se ha demostrado también que la exposición sistémica a los microorganismos periodontopatógenos aumenta los niveles de anticuerpos IgG contra *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, asociados a un aumento de posibilidad de riesgo cardiovascular (Jaramillo, 2013).

2.9 Tratamiento

Las terapias periodontales tienen como objetivo desacelerar o detener la progresión de la enfermedad para reestablecer la salud del periodonto. En particular, las terapias antimicrobianas

pueden agruparse en 3 categorías: 1) aquellas que físicamente remueven microorganismos, frecuentemente llamadas desbridamiento mecánico; 2) aquellas que intentan matar o afectar el metabolismo del organismo, tales como los antisépticos y antibióticos; y por último, 3) las que afectan el ambiente de los organismos (Mombelli, 2011).

Adicionalmente al tratamiento antimicrobiano, con el objetivo de retrasar el avance de la enfermedad, se pueden administrar medicamentos para controlar la respuesta del cuerpo a las bacterias que producen la enfermedad, como, por ejemplo, antiinflamatorios.

2.9.1 Control mecánico

El raspado es el procedimiento (tratamiento mecánico) por medio del cual se eliminan la placa dentobacteriana y los cálculos de las superficies dentales supragingivales y subgingivales. Es el tratamiento más efectivo para las enfermedades periodontales.

2.9.2 Control con antibióticos

Los antibióticos sistémicos pueden ser auxiliares útiles del tratamiento mecánico de las enfermedades periodontales agresivas y en ocasiones, de la enfermedad activa. Al proveer un beneficio terapéutico adicional, los antibióticos sistémicos pueden reducir la necesidad de proseguir con el tratamiento quirúrgico (Mombelli, 2011). En general, los antibióticos se pueden usar para: 1) tratar pacientes que no responden a la terapia mecánica convencional, 2) pacientes con infecciones agudas periodontales asociadas a manifestaciones sistémicas, 3) como profilaxis en pacientes comprometidos médicamente, y 4) como coadyuvantes en procedimientos periodontales quirúrgicos y no quirúrgicos.

La eficacia de la terapia antibiótica periodontal está determinada por el espectro antimicrobiano, las características farmacocinéticas del medicamento y los factores locales ambientales, incluyendo la afinidad del medicamento a los tejidos, la protección de los patógenos por unión, la carga total bacteriana relacionada con la concentración máxima de antibiótico, la efectividad

del sistema de defensa del paciente y los patógenos en los tejidos periodontales, superficies radiculares y sitios extradentales no afectados por la terapia.

El espectro de la actividad es el conjunto de bacterias cuyo crecimiento queda inhibido por un antibiótico. Este espectro puede variar ya que la sensibilidad de los gérmenes se modifica. Para estudiar dicha sensibilidad, se debe practicar un antibiograma en el laboratorio. La concentración mínima inhibitoria es la cantidad más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento de la colonia bacteriana *in vitro*. Esta concentración mínima inhibitoria es una aproximación a la concentración eficaz *in vivo*, debido a la variabilidad de la concentración tisular y de la unión a proteínas plasmáticas tisulares (Bascones & Legido 2000).

Un antibiótico ideal en la prevención y el tratamiento debe ser específico para los patógenos periodontales, alogénico y no tóxico, sustantivo, no de uso general para otras enfermedades y económico. En la actualidad no existe un antibiótico ideal para el tratamiento de las enfermedades periodontales (Ciancio & Mariotti, 2014).

Las tetraciclinas se usan en el tratamiento de las enfermedades periodontales, tienen la capacidad de concentrarse en los tejidos periodontales e inhiben el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*. Estos fármacos son bacteriostáticos y efectivos contra las bacterias que se multiplican rápidamente y principalmente contra las bacterias Gram positivas. Pueden eliminar las bacterias del tejido y se ha demostrado que detienen la pérdida ósea y suprimen los niveles de *A. actinomycetemcomitans* en conjunto con el raspado y el alisado radicular (Ciancio & Mariotti, 2014).

Por otra parte, las quinolonas representan una nueva alternativa en la terapia periodontal debido a su actividad contra los periodontopatógenos y los bacilos entéricos Gram negativos. Además, presentan una reducida resistencia bacteriana y tienen alta difusión tisular con buena absorción; por ejemplo, la ciprofloxacina es una quinolona activa contra patógenos periodontales anaeróbicos Gram negativos. Es el único antibiótico en el tratamiento periodontal al que son susceptibles todas las cepas de *A. actinomycetemcomitans* (Ciancio & Mariotti, 2014; Cruz, 2014). Por su parte, la moxifloxacina, además de ser eficaz contra los principales

periodontopatógenos, tiene un efecto inmunomodulador importante en el proceso inflamatorio de la periodontitis, que debe tenerse en cuenta en la toma de decisiones clínicas para el tratamiento de esta enfermedad (Ardila, 2016).

Aunque la administración de antimicrobianos es muchas veces requerida en la terapia periodontal, también es necesario mencionar que puede dar lugar a la manifestación de efectos adversos en el paciente, los cuales van desde disnea y alteración al gusto, hasta diarrea y daño hepatocelular (Cruz, 2014). En la Tabla III se muestran los efectos adversos de algunos antibióticos usados en el tratamiento de enfermedades periodontales.

Además, el uso común e indiscriminado de antibióticos a nivel mundial ha contribuido a un número mayor de cepas bacterianas farmacorresistentes en los últimos años, y es probable que continúe esta tendencia (Ciancio & Mariotti, 2014). Por lo tanto, es necesario proponer alternativas para mejorar las terapias antimicrobianas, ya sea con la incorporación de nuevos compuestos antibióticos, o con el uso de coadyuvantes naturales (i.e. extractos vegetales o aceites esenciales) que potencialicen el efecto de los tratamientos ya existentes.

Tabla III. Efectos adversos de antibióticos usados en el tratamiento de periodontitis (Mombelli, 2011).

Antibiótico	Efectos frecuentes	Efectos no frecuentes
Penicilinas	Hipersensibilidad, náuseas, diarrea	Toxicidad hematológica, colitis pseudomembranosa, encefalopatía
Tetraciclinas	Intolerancia gastrointestinal, candidiasis, pigmentaciones dentarias e hipoplasia en la infancia, náuseas, diarrea, interacción con anticonceptivos orales	Fotosensibilidad, neurotoxicidad, hipertensión intracraneal
Metronidazol	Intolerancia gastrointestinal. Náuseas, efecto antabús, diarrea, sabor metálico desagradable	Neuropatía periférica, lengua fisurada
Clindamicina	Erupciones cutáneas, náuseas, diarrea	Colitis pseudomembranosa, hepatitis

2.9.3 Control con antisépticos

Los agentes antiplaca se definen como compuestos químicos, que tienen un efecto en la placa suficiente para evitar la gingivitis y/o caries. Conceptualmente, los agentes antiplaca son utilizados para interferir en la adhesión de las bacterias orales a superficies y así prevenir la

formación de la biopelícula; asimismo, interfieren en los mecanismos de coagregación y afectan la vitalidad bacteriana mediante la prevención del crecimiento de colonias (Baenhi & Takeuchi, 2003).

En Odontología es muy conocido el impacto de los fluoruros como agentes de prevención de caries, sin embargo, su efecto sobre las bacterias implicadas en la formación de placa y gingivitis es poco claro. Se asume que su mecanismo antimicrobiano está relacionado con una alteración en la agregación bacteriana, además de que puede inducir una acumulación de elementos intracelulares que afecta la actividad metabólica. Por ejemplo, se ha reportado que *S. mutans* se presenta ocho veces menos en los grupos experimentales tratados con fluoruro que en los controles. También se ha reportado que con el fluoruro estañoso la gingivitis es menos severa (Bellaiza, 2013).

El triclosán es un agente antibacteriano de amplio espectro, no catiónico, sin efectos colaterales conocidos. Este compuesto es usado en desodorantes, jabones y otras aplicaciones dermatológicas. Es considerado seguro para su uso en dentríficos y enjuagues orales. Usado como enjuagatorio oral produce una disminución de la placa supragingival de alrededor del 31% comparada con un placebo (Bellaiza, 2013).

2.10 Clorhexidina

La clorhexidina (CHX) es el antiséptico más efectivo del grupo de las biguanidas. Es incolora, inodora y de gusto amargo. Se ha encontrado actividad antibacteriana contra *Streptococcus sabrinus* en los fibroblastos del ligamento periodontal en concentraciones al 10 y 15%. Ha demostrado ser eficaz en la reducción de la viabilidad de la biopelícula cuando se aplica a la superficie antes de la exposición a las bacterias y posteriormente, en la biopelícula (Baenhi & Takeuchi, 2003).

La CHX es uno de los compuestos más probados y sus propiedades antiplaca son bien conocidas. Las moléculas de CHX, inicialmente, son adsorbidas por la superficie del esmalte o la película salival de manera que inhiben la adhesión bacteriana (Bascones *et al.*, 2002). La

principal aplicación de la CHX ha sido para el control de la placa dental. Sin embargo, también es eficaz en la periodontitis. Se utiliza principalmente en enjuagues bucales y se recomienda en la fase higiénica del tratamiento como complemento del cepillado dental (Betancourth *et al.*, 2006).

Es una molécula bicatiónica simétrica consistente en dos anillos: 4-clorofenil y dos grupos biguanida conectados por una cadena central de decametileno (clorofenil biguanida). Su mecanismo de acción se relaciona con sus características fisicoquímicas. Debido a sus propiedades catiónicas, la CHX se une a la hidroxiapatita del esmalte de los dientes, a la película adquirida y a las proteínas salivales, provocando la desestabilización de las células bacterianas y penetrando en las membranas de éstas. La CHX precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular (Garcillan & Rioboo, 2000).

Se ha sugerido que la acción antiplaca de la CHX involucra distintos mecanismos:

- Reduce el número de bacterias en saliva,
- Bloquea los grupos ácidos de las glucoproteínas salivales, reduciendo así la adsorción de proteínas a la superficie dental,
- Se une a la superficie de bacterias salivales, incluyendo cubiertas de polisacáridos, lo cual sugiere una acción de interface en la adsorción de la bacteria a la superficie del diente,
- Precipita los factores de aglutinación en la saliva y desplaza al calcio, el cual es el principal factor para el efecto adhesivo de la placa (Hernández, 2016).

En cuanto a los efectos tóxicos y adversos de la CHX, no se ha descrito toxicidad sistémica ni resistencia bacteriana a la CHX, sin embargo, el uso prolongado en la boca produce un leve desplazamiento de la flora hacia microorganismos menos sensibles. Su efecto adverso más común es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobre todo del dorso de la lengua. Otro efecto secundario frecuente es la alteración del gusto. Se han descrito también lesiones descamativas en la mucosa alveolar después de enjuagues al 0.2%. La descamación de células epiteliales puede ocurrir con mayor frecuencia a

alta concentración (Tsourounakis *et al.*, 2013). Aunque es bien conocido el efecto antigingivitis de la CHX, sus efectos adversos podrían limitar su aplicación contra patógenos periodontales.

Otro punto limitante hoy en día es que los microorganismos orales han desarrollado resistencia a antibióticos y químicos sintéticos. Así, muchos productos para higiene oral han disminuido su eficacia clínica. Por su parte, sustancias sintéticas también han provocado severos efectos adversos, tales como vómito, diarrea y cambio en la coloración de los dientes. A raíz de estas inconvenientes los extractos de plantas y otras sustancias antimicrobianas de origen natural muestran una atractiva alternativa para su uso como agentes antimicrobianos incorporados en enjuagues bucales y pastas dentales (Khazila, 2015).

2.11 Importancia de plantas y productos naturales en la salud oral

El incremento del uso de plantas medicinales ha renovado el interés en los efectos de los extractos de plantas para el control de la placa dentobacteriana y otras enfermedades bucales. La detección de agentes antimicrobianos aislados de las plantas es un enfoque factible para la identificación de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas contra patógenos dentales.

Entre las sustancias utilizadas para el control de placa dental también se puede nombrar el uso de aceites esenciales (AE), productos naturales con actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria que podrían mejorar el efecto de la CHX en el tratamiento de la gingivitis (Bascones & Legido, 2000).

2.11.1 Aceites esenciales en Odontología

Los AE son mezclas de compuestos de bajo peso molecular obtenidos de plantas por medio de hidrodestilación. Ocheng y colaboradores (2015), encontraron que AE de 10 plantas aromáticas medicinales (*Bidens pilosa*, *Helichrysum odoratissimum*, *Vernonia amygdalina*, *Hoslundia opposita*, *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Teclea nobilis*, *Zanthoxylum chalybeum* y *Lantana trifolia*) mostraron efectos inhibitorios significativos sobre

patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, así como efectos moderados en la inhibición del cariogénico *Streptococcus mutans*. La evaluación antimicrobiana se realizó por medio de la técnica de dilución en caldo. El AE más efectivo fue el de *C. nardus*, mostrando un efecto inhibitorio contra *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* y efecto moderado contra *S. mutans* a concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01%, respectivamente.

En otro estudio, Allaker y Douglas (2009) encontraron que los enjuagues bucales a base de AE, como el aceite de árbol de té australiano, aceite de menta y aceite de salvia, destruyen eficazmente los patógenos orales mediante diversos mecanismos: 1) interrupción de la pared celular, 2) inhibición de enzimas clave, 3) desaceleración de la replicación, 4) reducción de la liberación de endotoxinas y 5) desagregación de bacterias en la matriz de la placa.

Cabe señalar que el uso de AE en productos odontológicos no está lejos de ser una realidad. El colutorio *Listerine*^{MR} es una preparación comercial de timol, eucaliptol, salicilato de metilo, mentol y etanol. Su mecanismo de acción contra las bacterias es complejo. Principalmente, produce una desnaturalización proteínica y daño a la membrana celular, induciendo una filtración de componentes intracelulares. El uso de *Listerine*^{MR} induce la muerte de los microorganismos completa o casi completa 24 h después de un tratamiento de 60 segundos para gingivitis. Del mismo modo, se ha demostrado que un tratamiento de 30 segundos del enjuague bucal produce una reducción en la viabilidad celular (Vlachojannis *et al.*, 2015).

Los AE, como remedio natural, en comparación con la CHX ofrecen cuatro ventajas: 1) no producen pigmentación en los dientes, 2) no alteran la percepción del gusto, 3) no promueven la formación de cálculos y, 4) su eficacia no disminuye con la presencia de pastas dentales (Kazhila, 2015).

2.11.2 Aceite esencial de eucalipto

El árbol de eucalipto, del género *Eucalyptus*, tiene una diversidad de más de 500 especies. Es un árbol maderero importante que se encuentra en casi todos los tipos de suelos, desde ácidos

hasta alcalinos. Los eucaliptos son originarios de Australia y algunos países de Asia Sudoriental, donde crecen en condiciones muy diversas de pluviosidad y temperatura. Se emplean las hojas en infusión, las cuales son eficaces en fiebres intermitentes y dan buen resultado en casos de bronquitis. Es un desinfectante muy poderoso (Granados & López, 2007). Se ha demostrado que extractos acuosos a partir de las hojas de esta planta presentan propiedades antiinflamatorias (Bacallao *et al.*, 2002).

En las aplicaciones medicinales que posee este árbol, se utilizan sobre todo las hojas de la especie *E. globulus*, principalmente, por poseer tres importantes propiedades: antiinflamatoria, antimicrobiana y expectorante (Awol *et al.*, 2016). Básicamente, se emplea en afecciones respiratorias de diversa índole: bronquitis, asma, faringitis, amigdalitis, gripes y resfriados. Respecto a su capacidad antimicrobiana, con su uso se consigue acabar con aquellos microorganismos que son los causantes de procesos infecciosos en las vías respiratorias, así como también puede menguar los efectos dolorosos de las migrañas y es útil en el tratamiento de la disentería, las fiebres tifoideas y la difteria. Su acción antiviral funciona bien en el tracto digestivo, calma la inflamación y alivia las mucosidades (Castillo, 2017; Khazila, 2015).

En Odontología, el aceite de eucalipto se incluye en los productos utilizados como selladores y disolventes para obstrucciones del conducto radicular, se utiliza como enjuague bucal, así como en otros productos como pastas dentales (Bascones *et al.*, 2002). Es posible que el efecto de la CHX pueda mejorar al combinarse con el aceite de eucalipto, principalmente, debido a las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes de este último.

Knezevic y colaboradores (2016) evaluaron la actividad antimicrobiana del AE de *Eucalyptus camaldulensis* en combinación con agentes antimicrobianos convencionales como la ciprofloxacina, la gentamicina y la polimixina B. Los resultados mostraron que el AE es un agente antimicrobiano adecuado contra *Acinetobacter baumannii* multifármacorresistente a los agentes antimicrobianos convencionales, demostrando así que la sinergia del AE con los fármacos convencionales es una opción viable en tratamientos antimicrobianos.

En otro estudio, Bagora y col. (2014) reportaron efectos antioxidantes, antiproliferativos y antiinflamatorios del aceite esencial de *E. camaldulensis*, y de otros aceites obtenidos de *Ocimum basilicum*, *Hyotis spicigera*, *Lippia multiflora* y *Ageratum conyzoides*. La actividad antioxidante fue examinada usando los métodos 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) y 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). *O. basilicum* y *L. multiflora* exhibieron la mayor actividad antioxidante en las pruebas DPPH y ABTS, respectivamente. Las propiedades antiinflamatorias fueron evaluadas midiendo la inhibición de la actividad de la lipoxigenasa, siendo el AE de *Z. officinale* el más activo. En la actividad antiproliferativa, los AE de *A. conyzoides* y *L. multiflora* fueron los más activos en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3, respectivamente. La línea celular de glioblastoma SF-767 fue la más sensible a *O. basilicum* y *L. multiflora*, mientras que el aceite esencial de *A. conyzoides* mostró la mayor actividad en las células de glioblastoma SF-763.

Por su parte, Huey y col. (2015) investigaron el efecto antimelanogénico y antioxidante de *E. camaldulensis* por medio de ensayos en la actividad de proteínas relacionadas con la melanogénesis. Los resultados revelaron que el AE de la flor de *E. camaldulensis* suprimía la actividad de la tirosinasa y por ende, decrecía la síntesis de la melanina. De esta manera también disminuían los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo.

En un estudio realizado por Abdul *et al.*, (2015) se demostró la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de AE de *Eucalyptus citriodora*, *E. melanophloia*, *E. crebra*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *E. microtheca*, y se determinó que tenían un alto potencial para su aplicación medicinal y nutricional. El AE tomado a partir de la hoja, reveló alta sensibilidad bactericida contra bacterias Gram positivas y negativas, entre ellas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

Asimismo, Mulyaningsih y col. (2011) investigaron la actividad antibacteriana del AE de eucalipto. Además, se identificó a los principales componentes del AE que le otorgan esta propiedad. Se realizó un experimento con aceites esenciales de fruta y hoja de *E. globulus*, mostrando que los componentes del AE presentaban actividad contra bacterias Gram negativas multifármacorresistentes.

Rantsch y col. (2009) evaluaron a los AE de eucalipto y de naranja en función de sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Ambos aceites demostraron propiedades antioxidativas en cultivos *ex vivo* de macrófagos pulmonares, disminuyendo significativamente la emisión de citocinas y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en 21.8 y 23.6% para los AE de eucalipto y naranja, respectivamente.

Salem y col. (2015) también reportaron el efecto antioxidante y antibacteriano de diferentes especies de eucalipto: *E. camaldulensis*, *E. camaldulensis* var. *Obtusa* y *E. gomphocephala*. Se utilizó el AE de la hoja y se encontró que a bajas concentraciones inhibía el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas, como de Gram negativas. Los principales compuestos encontrados en el AE, por medio de las técnicas de GC-MS y GC-FID, fueron 1,8-cinenol, β -pineno, metileugenol, *p*-cimeno, y espatulenol.

En otro estudio, Saranya y col. (2015) reportaron el efecto antibacteriano de una nanoemulsión del AE de eucalipto impregnado en una película de quitosán. Se demostró *in vitro* el efecto del aceite utilizando patógenos clínicos como *S. aureus*; además, se encontró que el aceite presentaba mayor efecto antibacteriano combinado con la película de quitosán. Por otra parte, Raho & Bernali (2012) también realizaron un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana del AE de la hoja de *E. globulus* ante *E. coli* y *S. aureus*. Se demostró la eficacia del AE como un antibiótico natural, con un potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por estos patógenos. En un estudio similar, llevado a cabo por Hajer y col. (2011), se determinó la composición química y la actividad antimicrobiana de *E. oleosa*, concluyendo que el uso de los extractos de hojas, tallo, flores y frutos inmaduros presentan actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como también actividad antifúngica. Además, se encontró una fuerte correlación entre la presencia de monoterpenos oxigenados y la actividad antimicrobiana, especialmente, en el caso del 1,8-cineol contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, respectivamente.

Safaei y Atefeh (2010) reportaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas del AE de *E. largiflorens* y *E. intertexta* contra once microorganismos, entre los cuales se incluían a

Aspergillus niger, *C. albicans*, *P. aeuroginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella entérica (paratyphi- A)*. De los once microorganismos, en siete de ellos fue inhibido el crecimiento por los AE de eucalipto, a excepción de *P. aeuroginosa*, *E. coli* y *Sh. dysenteriae*. En el caso de *E. largiflorens* y *E.intertexta*, las zonas de inhibición máxima y los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para las cepas bacterianas que eran sensibles a los AE estuvieron en los intervalos de 7.8-15.6 µg/mL y 62.5 µg/mL, respectivamente.

En otro tipo de estudios, Serafino y col. (2008) reportaron el uso del AE de eucalipto para estimular la respuesta inmune innata. El AE fue evaluado *in vitro* utilizando sangre periférica e induciendo la activación de los macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMs) para estimular su respuesta fagocítica; también se determinó una disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias. En particular, debido a sus propiedades antisépticas y antiinflamatorias, se sugirió el uso del AE para aumentar la actividad fagocítica de los monocitos durante las quimioterapias; además, se propuso como agente inmunorregulador, útil como coadyuvante en patologías inmunosupresoras y en otras enfermedades infecciosas.

Especialmente, en el área odontológica se han demostrado las propiedades antimicrobianas del AE del eucalipto. Rasooli y Shayegh (2008) evaluaron el efecto de *Mentha spicata* y *E. camaldulensis* sobre la formación de la biopelícula oral. Se comparó con el efecto de la CHX *in vitro* e *in vivo* contra los patógenos *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, demostrando que la concentración mínima bactericida (CMB) es menor que la requerida por el fármaco, ya que estos fueron de 4 y 2 mg/mL para *M. spicata* y *E. camaldulensis* respectivamente, Además, se retardó significativamente la formación de la biopelícula. En todas las concentraciones evaluadas, con el AE de eucalipto se obtuvieron resultados con diferencias significativas ($P < 0.001$), mayor efectividad que el AE de *M. spicata*, por lo que se propuso que su uso podría contribuir en el desarrollo de tratamiento anticaries. En otro estudio, Dagli y col. (2015) reportaron que los AE de eucalipto, lavanda y limón presentaban potencial para prevenir el desarrollo de agentes patógenos de enfermedades orales. Los investigadores concluyeron que los AE podrían tener una eficacia y viabilidad *in vivo*, lo cual podría promover su uso en la terapia dental para mejorar la calidad de los tratamientos odontológicos.

Tanaka y col. (2010) evaluaron el efecto del AE de eucalipto, incorporado en una goma de mascar, sobre su capacidad para reducir el mal olor y disminuir la cantidad de patógenos periodontales que se encuentran en la lengua y la placa dental. La goma a base de eucalipto logró reducir significativamente el mal olor, realizando diferentes análisis sensoriales. Además, se mostró evidencia *in vivo* sobre el potencial del efecto antibacteriano contra patógenos como *P. gingivalis* y *P. intermedia*.

En un estudio realizado por Takarda *et al.*, (2004) se investigó la actividad antimicrobiana del AE de eucalipto y de otros extractos de plantas como manuka, lavanda y romero. El estudio se enfocó contra agentes periodontopatógenos y bacterias cariogénicas, responsables de la formación de biopelícula en la placa dental. Los autores evaluaron la CMI de cada AE, destacando el de manuka como el más efectivo. El resto de los AE también presentaron actividad antimicrobiana contra *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *S. mutans* y *S. sobrinus*.

El efecto antibacteriano de los AE puede incrementarse al utilizar mezclas de ellos. Karbach y col. (2015) reportaron un estudio *in vitro* de las propiedades antibacterianas de los AE de eucalipto, limón y una mezcla de ambos en comparación con antisépticos comunes utilizados en higiene oral, tales como la CHX, una solución de povidona yodada (BTA) y el dicloruro de octinidina. El estudio mostró que el uso de AE resultó más eficaz que algunos antisépticos convencionales; además, los autores sugirieron que la aplicación de los AE en higiene oral podría evitar farmacoresistencia.

En una revisión bibliográfica realizada por Byalakere y col. (2015) se reporta la aplicación de productos naturales para el control de enfermedades orales, entre los que se encuentran los extractos de *Azadirachta indica*, *Ocimum sanctum*, *Murraya koenigii*, *Acacia nilotica*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Hibiscus sabdariffa*, *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, *Rosa indica* y *Aloe barbadensis*. Los autores establecieron que el uso de extractos de plantas presenta una interesante alternativa a los antimicrobianos sintéticos, debido principalmente a su potencial efecto contra la caries dental y patógenos periodontales, así como también a que pueden ayudar a reducir la resistencia a fármacos durante la terapia.

3. JUSTIFICACIÓN

La caries dental y la enfermedad periodontal son entidades infecciosas, transmisibles e inducidas por la placa dental, que difieren por el tipo de microorganismos que las produce. La caries dental produce una desmineralización de la superficie del diente, causada por bacterias que se adhieren a la superficie dentaria y la enfermedad periodontal (enfermedad de las encías) es la causa principal de la pérdida de dientes en los adultos. En particular, la enfermedad periodontal afecta a hombres y mujeres entre 5 y 30%. De acuerdo con reportes de la OMS el 15% de los adultos padecen enfermedad periodontal avanzada. Existen múltiples fármacos utilizados en el control de placa entre ellos destacan los antibióticos (penicilina, vancomicina y kanamicina), los antisépticos bisguanídicos (clorhexidina, alexidina y octenidina) y compuestos de amonio cuaternario y fluoruros. Sin embargo, los primeros ocasionan efectos adversos en el paciente, los cuales van desde disnea y alteración al gusto, hasta diarrea y daño hepatocelular. En el caso de la CHX, su uso prolongado produce pigmentación marrón de dientes y materiales de restauración, alteración del gusto y lesiones descamativas en la mucosa. Además, se ha asociado como posible causa de la selección y persistencia de cepas bacterianas con bajo nivel de resistencia a los antibióticos. Por lo anterior, los productos naturales pueden ser una alternativa viable para mejorar la efectividad de los tratamientos contra las enfermedades periodontales. Se ha reportado que los aceites esenciales (AE), como el del eucalipto, presentan actividades antimicrobianas y antioxidantes que podrían ser aprovechadas en los tratamientos odontológicos. Entre las ventajas que presentan los aceites esenciales sobre la clorhexidina, tenemos que, no producen pigmentación en los dientes, no alteran la percepción del gusto, no promueven la formación de cálculos y su eficacia no disminuye con la presencia de pastas dentales. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial del AE de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*) para ser usado como coadyuvante en la prevención y tratamiento de enfermedades periodontales.

4 HIPÓTESIS

El aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*) presenta actividades antimicrobianas y antiinflamatorias las cuales le confieren un efecto potenciador en el tratamiento de enfermedades periodontales.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de las actividades antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana y antihemolítica del aceite esencial de *E. tereticornis* para su posible aplicación odontológica

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar químicamente los aceites esenciales de hoja y fruto de *E. tereticornis* por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas y cromatografía de gases FID.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *E. tereticornis* contra la bacteria odontopatógena *Streptococcus gordonii*.
- Evaluar el efecto tóxico de los AE mediante los bioensayos sobre *Artemia salina* y por hemólisis eritrocitaria.
- Determinar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales mediante el ensayo de DPPH.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

6.1.1 Obtención del aceite esencial

Las hojas y frutos de *E. tereticornis* fueron obtenidos de árboles ubicados en el municipio de Montemorelos, N.L. Los AE de hoja (AEh) y fruto (AEf) de *E. tereticornis* se obtuvieron por hidrodestilación en un equipo Clevenger modificado. El AE recuperado se almacenó protegido de la luz a -4°C. El rendimiento de extracción del aceite se calculó de acuerdo con la Fórmula 1.

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Peso del aceite esencial}}{\text{Peso de la planta}} \times 100 \quad \text{Fórmula 1}$$

6.1.2 Caracterización por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) y por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama (CG-FID)

Para identificar los componentes de los AE de *E. tereticornis* se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (St. Clara, CA, USA), con una columna capilar Elite-5 (30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) y acoplado a un espectrómetro de masas selectivo, 5973 INERT (HP5MS). La temperatura de la fuente de ionización fue 230 °C, la del cuadrupolo fue de 150 °C y la del inyector 220 °C. Para cada corrida, el programa de temperatura del horno del CG fue 35°C por 9 min, incrementando 3°C/min hasta 150°C por 10 min; después se incrementó 10°C/min hasta 250°C y, finalmente, se incrementó 3°C/min hasta 270°C por 16 min. El flujo del gas acarreador (helio, 99.9% de pureza) fue de 2 mL/min. La energía de ionización fue de 70 eV. Las muestras fueron inyectadas en modo *splitless*. El espectrómetro de masas fue empleado en modo de barrido. Los componentes de los AE fueron identificados por comparación de sus índices de retención relativos con los *n* alcanos C8–C20 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) y por comparación de su espectro de masas con los datos de referencia de

la librería *US National Institute of Standards and Technology* (NIST) (Adams, 2007). Para el análisis cuantitativo, se utilizó un cromatógrafo de gases con detección de ionización de flama (Clarus 480 GC, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) con una columna capilar Elite-5 (30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) con el mismo programa de temperatura del horno anteriormente mencionado. La composición porcentual por CG-FID de cada componente, se analizó por el método de normalización de áreas.

6.2 Determinación del efecto antiproliferativo de los aceites esenciales en *Streptococcus gordonii*

Para determinar el efecto de los AE de *E. tereticornis* sobre la proliferación microbiana, se trabajó con el método en microplaca de 96 pozos bajo los estándares del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). Se utilizó medio de cultivo soya tripticasa en condiciones aerobias a 37°C. Con el método de turbidez (600 nm en absorbancia), y utilizando como referencia el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland, se ajustó un cultivo de 24 h a 1×10^8 UFC/mL y se diluyó 100 veces, después 50 µL de esta suspensión bacteriana se transfirieron a cada pocillo para obtener así el inóculo deseado (50,000 UFC/pozo). A cada pozo se le agregaron los tratamientos (AEh y AEf) a diferentes concentraciones (65.2, 125, 250, 500 y 1000 µg/mL), utilizando CHX como control positivo, etanol al 1 % como control negativo y un cultivo sin tratamiento como control de proliferación. Se trabajó con un volumen final de 100 µL por pozo. Al pasar 24 h se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Espectrofotómetro EPOCH, Biotek). Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición de la proliferación de *S. gordonii* usando la Fórmula 2 (Wayne 2012; Sung-Hoon 2013). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con sus respectivos controles.

$$\% \text{ de inhibición de la proliferación bacteriana} = \frac{ABS_{Ctrl} - (ABS_{Mtra} - ABS_{Bco})}{ABS_{Ctrl}} \times 100 \quad \text{Fórmula 2}$$

Dónde:

ABS_{Ctrl} = Absorbancia del control de proliferación

ABS_{Mtra} = Absorbancia de la muestra (cultivos tratados)

ABS_{Bco} = Absorbancia de los blancos

6.3 Determinación de capacidad antioxidante de los aceites esenciales por la técnica de captación de radical DPPH

Entre los ensayos de captación de radicales, el método basado en el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, conocido como DPPH, es de los más rápidos, de metodología sencilla y de menor costo en comparación con otros modelos. Se prepararon soluciones en metanol del AE de *E. tereticornis* a diferentes concentraciones (250–8,000 ppm). De la misma manera, se utilizó un antioxidante control de referencia (carvacrol) y una solución blanco de DPPH (80 µg/mL) en metanol. En seguida, se mezclaron 2 volúmenes iguales de AE y de DPPH (1000 µL) y se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Posteriormente, se leyó la Densidad Óptica (DO) en un espectrofotómetro (GENESYS 20, Thermo Scientific) a $\lambda = 517$ nm. A partir de la Fórmula 3 se calculó del porcentaje de inhibición (% INH). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con sus respectivos controles.

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{ABS_{Bco} - ABS_{AE}}{ABS_{Bco}} \right) \times 100 \quad \text{Fórmula 3}$$

Dónde:

ABS_{Bco} = Absorbancia del blanco

ABS_{AE} = Absorbancia de la mezcla AE y DPPH

6.4 Determinación de polifenoles totales en los aceites esenciales

La determinación se llevó a cabo por el método de Folin Ciocalteu modificado, descrito previamente por Wotton-Beard y col. (2011). Inicialmente, fue realizada una curva de calibración usando como estándar ácido gálico. Para la cuantificación de muestras se preparó una solución de trabajo en etanol (ST) de 1,000 µg/mL del AE de *E. tereticornis*. La elaboración de los sistemas se llevó a cabo diluyendo 500 µL de ST en 1,100 µL de agua destilada, a los que fueron agregados 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). La mezcla se dejó reposar durante 8 min y, posteriormente, se agregaron 300 µL de solución de carbonato de sodio al 20 % (p/v). Finalmente, se incubaron los sistemas durante 2 h a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La DO de los sistemas se midió a $\lambda = 765$ nm en un lector de multiplacas (Espectrofotómetro EPOCH, Biotek). Los resultados se expresaron en µg de

equivalentes de ácido gálico/mL de muestra. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con sus respectivos controles.

6.5 Determinación de flavonoides totales en los aceites esenciales

Para determinar el contenido de flavonoides totales se realizó una curva de calibración con concentraciones de quercetina de 3.3, 6.6, 10, 13.3 y 16.6 $\mu\text{g/mL}$, preparadas a partir de una ST de 0.25 mg/mL en metanol (Garrido *et al.*, 2013). Posteriormente, se tomó un 1 mL de la ST de AE de *E. tereticornis* en metanol (100 mg/mL), y le fueron adicionados 480 μL de metanol y 20 μL de solución metanólica de 2-aminoetil difenilborato al 1 % (p/v). Posteriormente, se homogenizó la mezcla y se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a medir la DO de los sistemas a $\lambda=404$ nm en un espectrofotómetro (EPOCH, Biotek). Esta medición se realizó contra un blanco, el cual se elaboró igual que los sistemas de prueba, reemplazando el volumen de ST de AE de *E. tereticornis* con metanol. Los resultados se obtuvieron sustituyendo los valores de la ecuación de la recta y se expresaron en equivalentes de quercetina por gramo de AE. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con sus respectivos controles.

6.6 Determinación del efecto antiinflamatorio *in vitro* con albúmina sérica bovina

Para el ensayo de antidesnaturalización de albumina sérica bovina (BSA), descrito por Sakat *et al.*, (2009), inicialmente, se llevó a cabo la preparación de sistemas de prueba de 600 μL en microtubos añadiendo 500 μL de BSA (Sigma Aldrich) al 1% (p/v) disuelta en PBS (pH= 6.4) junto con diferentes concentraciones de AE de *E. tereticornis* (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) a partir de una ST de 1,200 $\mu\text{g/mL}$ en metanol. Posteriormente, los sistemas fueron incubados a en un horno (Yamato Scientific America, modelo DX602) a 73 °C por 7 min; finalizado este periodo, se dejaron atemperar por 20 min a 24 °C y se midió la DO de los sistemas a $\lambda=660$ nm (Espectrofotómetro EPOCH, Biotek). El diclofenaco sódico (Sigma Aldrich) y el metanol fueron utilizados como control positivo y negativo, respectivamente. Los resultados fueron expresados en porcentaje de efecto antiinflamatorio, el cual fue calculado usando la Fórmula 4. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con sus respectivos controles.

$$\% \text{ Efecto antiinflamatorio} = \frac{\text{ABS}_{\text{Bco}} - (\text{ABS}_{\text{Mtra}} - \text{ABS}_{\text{Control Mtra}})}{\text{ABS}_{\text{Bco}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 4}$$

Dónde:

ABS_{Mtra} = Absorbancia de muestra

ABS_{Bco} = Absorbancia del control negativo

$\text{ABS}_{\text{Control Mtra}}$ = Absorbancia del control de muestra

6.7 Efecto de los aceites esenciales en la expresión génica de citocinas proinflamatorias en monocitos de sangre periférica

En condiciones de esterilidad, los monocitos se aislaron con el Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare™). En una microplaca de 6 pozos, se cultivaron 1×10^6 células por pozo, utilizando 3 pozos para cada tratamiento: 1) Control negativo o control de expresión (células sin tratar), 2) Control positivo LPS 100 ng/mL (Sigma-Aldrich), 3) AEf (30, 50, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$) y 4) AEh de *E. tereticornis* (30, 50, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$). El cultivo de células con los respectivos tratamientos se incubó durante 24 h a 37 °C (5%, CO₂) en medio de cultivo RPMI suplementado (10% SFB, 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomocina, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina y 290 $\mu\text{g/mL}$ de L-glutamina). Después del periodo de incubación se retiró el medio de cultivo y se procedió con la extracción del RNA utilizando Trizol (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó y revisó la calidad del RNA con ayuda de un equipo Nanodrop™ 8000 (Thermo Scientific). Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), con muestras de 20 ng de RNA total. Para el análisis de expresión génica por PCR en tiempo real, se diseñaron oligonucleótidos dirigidos a los genes TNF- α (Fw: CCAGGGACCTCTCTCTAATCA; Rvs: TCAGCTTGAGGGTTTGCTAC), IL-8 (Fw: AAATCTGGCAACCCTAGTCTG; Rvs: GTGAGGTAAGATGGTGGCTAAT), IL-1 β (Fw: CTCTCACCTCTCCTACTCACTT; Rvs: TCAGAATGTGGGAGCGAATG) y como gen de referencia Beta Actina (Fw: GGCATCCTCACCCTGAAGTA; Rvs: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA). Las secuencias de mRNA fueron obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI). Las reacciones se realizaron utilizando Sybr Green/qPCR master mix 2X (Thermo-Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante, en un termociclador LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Mediante análisis de expresión relativa fueron calculados los valores de ciclo umbral (Cycle threshold Ct) y ratios

normalizados por el método de $\Delta\Delta C_t$ con ayuda del software Rest2009 (QIAGEN) (Young-il *et al.*, 2015).

6.8 Determinación de citotoxicidad *in vitro* por hemólisis eritrocitaria inducida

La actividad hemolítica de los AE de *E. tereticornis* se evaluó según lo descrito por Rodríguez y col. (2015) implementando ligeras modificaciones. Para el ensayo, fueron obtenidos los eritrocitos (RBC) en EDTA a partir de sangre de voluntarios sanos. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS (pH = 7.4), para finalmente obtener una suspensión de eritrocitos al 6.6 % (v/v). Así mismo, se preparó una ST de cada uno de los AE a una concentración de 1,000 $\mu\text{g/mL}$ utilizando PBS como diluyente, agregando un volumen no mayor a 20 $\mu\text{g/mL}$ de dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich).

Los sistemas de prueba se elaboraron utilizando ocho concentraciones en un rango de 10 a 500 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se añadieron 250 μL de la suspensión de RBC y PBS hasta obtener un volumen final de 1.25 mL. Seguido a esto, los sistemas se incubaron a 37°C por 30 min y se centrifugaron. Finalmente, se transfirió el sobrenadante de los sistemas a una placa de 96 pocillos donde se midió la DO a $\lambda = 540 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro (EPOCH, Biotek). Los controles positivo y negativo fueron elaborados reemplazando la muestra con un volumen igual de agua destilada y PBS, respectivamente. Los resultados se reportaron como porcentaje de hemólisis, el cual se determinó utilizando la Fórmula 5:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(ABS_{Mtra} - ABS_0)}{(ABS_c - ABS_0)} \times 100 \quad \text{Fórmula 5}$$

Dónde:

ABS_{Mtra} = Absorbancia de la muestra

ABS_0 = Absorbancia del PBS

ABS_c = Absorbancia del control positivo

6.9 Determinación de toxicidad por bioensayo con *Artemia salina*

La concentración letal media para cada uno de los AE se calculó mediante el ensayo con *A. salina* modificado en microplaca (Hamidi *et al.*, 2014). Inicialmente, los huevos de *A. salina* se sometieron a un tratamiento para inducir su eclosión. Simultáneamente, fue preparada una ST de cada AE de *E. tereticornis* a 1200 $\mu\text{g/mL}$ utilizando solución salina al 3.8 %, con un rango de concentraciones de 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. La prueba consistió en colocar 20 nauplios dentro de un pozo de una placa de 24 pocillos, para exponerlos a las diferentes concentraciones, durante 24 h. Posteriormente, se calculó el porcentaje de mortalidad generado en cada pozo, para realizar un análisis estadístico tipo PROBIT. El dicromato de potasio al 1% (p/v) y la solución salina, fueron utilizados como controles positivo y negativo, respectivamente.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización química de los aceites esenciales

Los AE de *E. tereticornis* fueron obtenidos a partir de la hoja (AEh) y el fruto (AEf) por la técnica de hidrodestilación con un equipo Clevenger modificado y se calculó su rendimiento de extracción con la Fórmula 1, obteniéndose un rendimiento de un 1.8 % para ambos aceites. En general, los rendimientos obtenidos a partir de materiales vegetales del eucalipto varían entre 0.45 y 2.3%. Dicha variación se debe principalmente a factores ambientales como temperatura, luz solar, minerales en el suelo, agua y hora de recolección, entre otros (Al-Maskri *et al.*, 2011).

Con respecto a la composición química, en la Figura 4-A se muestran los 22 componentes del AEh de eucalipto identificados por CG-MS, así como el porcentaje de abundancia y la clasificación de cada componente en la Tabla IV. Del perfil cromatográfico obtenido por CG-FID (Figura 4-B), se obtuvieron cinco componentes mayoritarios β -felandreno, α -felandreno, β -cariofileno, 1,8-cineol y biciclogermacreno. Este resultado coincide con lo reportado por Lucia *et al.*, (2009), donde se menciona que el β -felandreno es el principal componente del AE de *E. tereticornis* recolectado en Argentina. De igual forma, Filomeno *et al.*, (2016) reportaron que el AE de esta misma especie, pero cultivado en Brasil, era abundante en β -pineno, 1,8-cineol y α -pineno.

Con respecto al AEf de eucalipto, en la Figura 5-A se muestran los 13 componentes identificados por CG-MS, así como su porcentaje de abundancia y clasificación en la Tabla V. El perfil cromatográfico obtenido por CG-FID se muestra en la Figura 5-B.

De forma general, el AE de eucalipto es una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos, siendo los monoterpenos los principales componentes del aceite. En el caso del AEh, los monoterpenos representan el 65.7% y en el fruto el 72.5%. El alto contenido de monoterpenos está directamente asociado a su actividad biológica. El AE de *E. tereticornis* ha presentado propiedades antioxidantes (Singh *et al.*, 2009). Además, ha sido ampliamente utilizado como

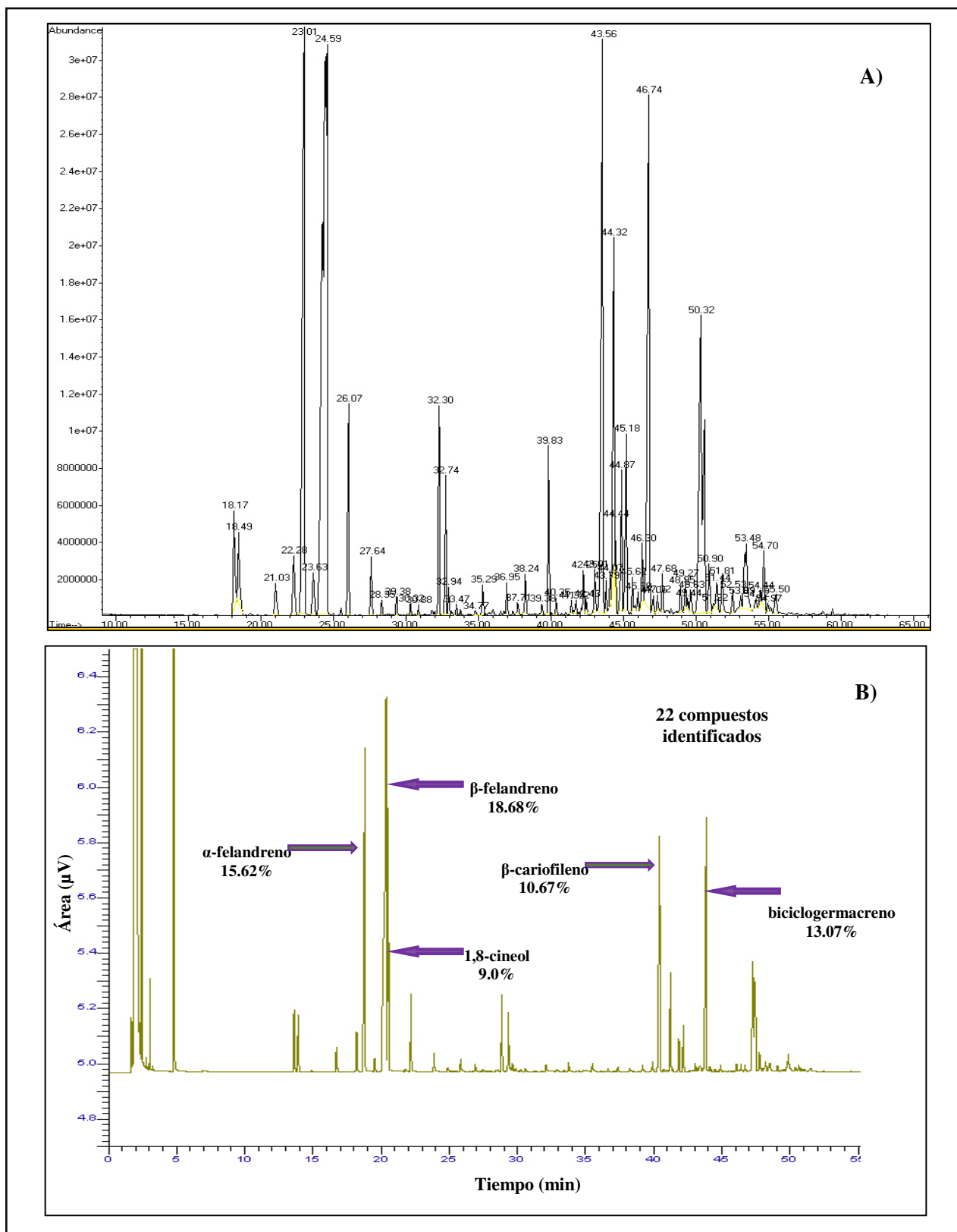


Figura 4. Cromatogramas del aceite esencial de la hoja de *E. tereticornis* obtenidos por A) Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-M) y B) Cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID).

como agente repelente de insectos. Además, el AE de las hojas ha presentado actividad larvicida contra *Anopheles stephensi* (Nathan, 2007) asociado a la presencia del 1,8-cineol, β -pineno y *p*-cimeno. De igual forma su actividad insecticida ha sido atribuida a la presencia del *p*-cimeno y 1,8-cineol (Bossou *et al.*, 2013).

Tabla IV. Componentes del aceite esencial de la hoja de *E. tereticornis*.

<i>Pico No</i>	<i>tr (FID)</i>	<i>Componente</i>	<i>Área</i>	<i>% Área</i>	<i>Clasificación</i>
1	13.62	α -tujeno	952.11	2.05	Monoterpeno hidrocarbonado
2	13.92	α -pineno	835.01	1.80	Monoterpeno hidrocarbonado
3	16.72	β -pineno	351.32	0.76	Monoterpeno hidrocarbonado
4	18.20	Mirceno	621.31	1.34	Monoterpeno hidrocarbonado
5	18.82	α -felandreno	7265.35	15.62	Monoterpeno hidrocarbonado
6	19.53	α -terpineno	158.81	0.34	Monoterpeno hidrocarbonado
7	20.21	<i>o</i> -cimeno	4009.36	8.62	Monoterpeno hidrocarbonado
8	20.37	β -felandreno	8687.52	18.68	Monoterpeno hidrocarbonado
9	20.53	1,8-cineol	4187.46	9.00	Monoterpeno oxigenado
10	22.19	γ -terpineno	1107.84	2.38	Monoterpeno hidrocarbonado
11	23.88	Terpinoleno	219.38	0.47	Monoterpeno hidrocarbonado
12	25.83	(<i>cis</i>) menth-2-en-1-ol	124.82	0.27	Monoterpeno oxigenado
13	28.87	Terpinen-4-ol	1188.04	2.55	Monoterpeno oxigenado
14	29.34	Criptone	837.08	1.80	Monoterpeno oxigenado
15	40.43	β -cariofileno	4962.40	10.67	Sesquiterpeno hidrocarbonado
16	41.23	Aromadendreno	1582.29	3.40	Sesquiterpeno hidrocarbonado
17	41.85	α -humuleno	468.90	1.01	Sesquiterpeno hidrocarbonado
18	42.18	(<i>allo</i>) Aromadendreno	666.76	1.43	Sesquiterpeno hidrocarbonado
19	43.86	Biciclogermacreno	6076.68	13.07	Sesquiterpeno hidrocarbonado
20	47.29	Espatulanol	1559.06	3.35	Sesquiterpeno oxigenado
21	47.41	Globulol	450.46	0.97	Sesquiterpeno oxigenado
22	47.76	Viridiflorol	199.10	0.43	Sesquiterpeno oxigenado

Monoterpenos: 52.05% hidrocarbonados, 13.63% oxigenados; Sesquiterpenos: 29.58% hidrocarbonados, 4.75% oxigenados.

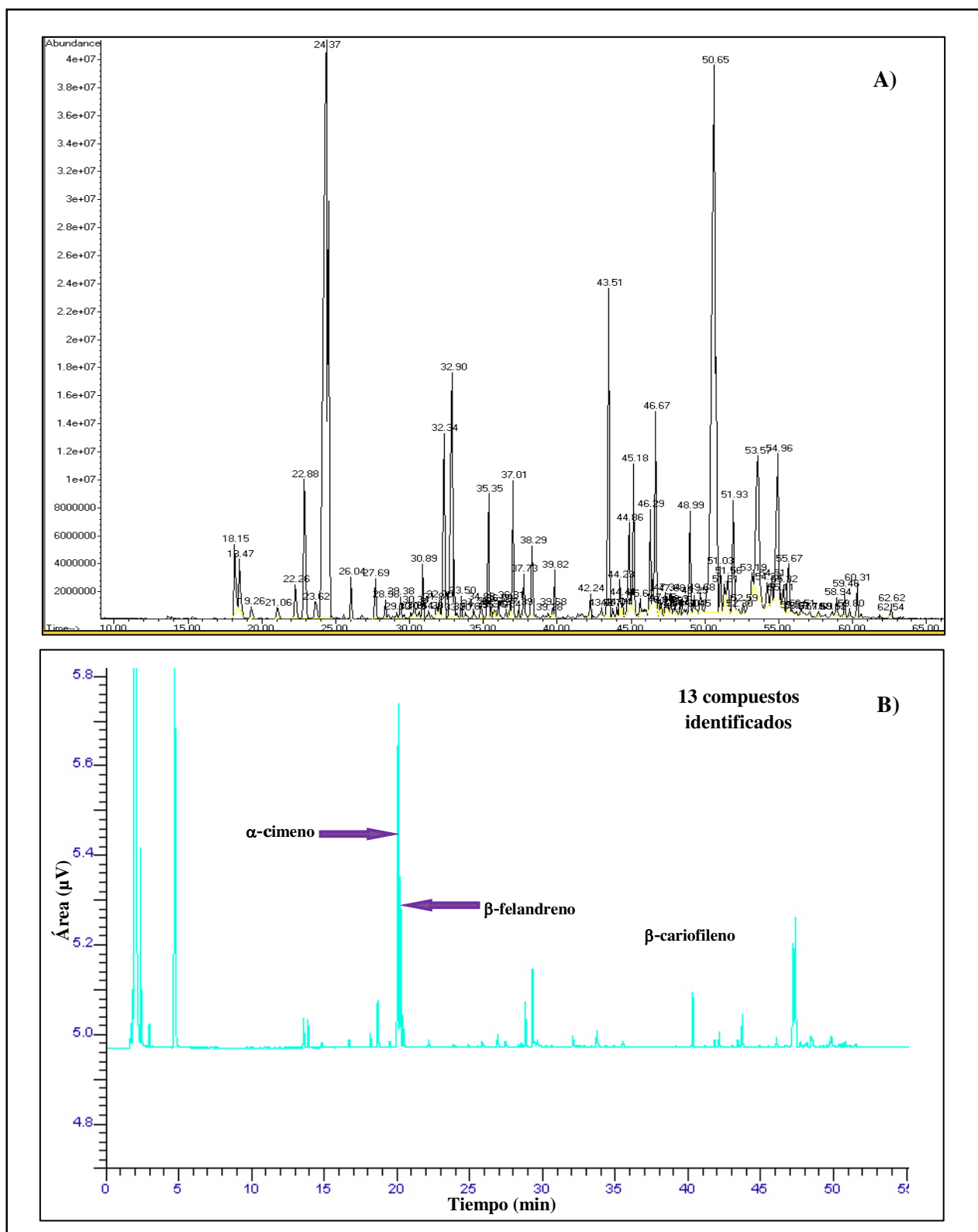


Figura 5. Cromatogramas del aceite esencial del fruto de *E. tereticornis* obtenidos por A) Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-M) y B) Cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID).

Tabla V. Componentes del aceite esencial del fruto de *E. tereticornis*.

No. Pico	tr (FID)	Componente	Área	% Área	Clasificación
1	13.59	α -tujeno	244.08	2.09	Monoterpeno hidrocarbonado
2	13.89	α -pineno	230.50	1.97	Monoterpeno hidrocarbonado
3	18.68	α -felandreno	405.24	3.47	Monoterpeno hidrocarbonado
4	20.10	o-cimeno	4429.43	37.88	Monoterpeno hidrocarbonado
5	20.24	β -felandreno	1767.63	15.12	Monoterpeno hidrocarbonado
6	20.41	γ -terpineno	224.23	1.92	Monoterpeno hidrocarbonado
7	28.82	Terpinen-4-ol	370.64	3.17	Monoterpenos oxigenados
8	29.32	criptone	661.38	5.66	Monoterpenos oxigenados
9	33.73	acetato de linalool	91.31	0.78	Monoterpenos oxigenados
10	40.32	β -cariofileno	468.35	4.01	Sesquiterpenos hidrocarbonado
11	43.72	Biciclogermacreno	225.18	1.93	Sesquiterpenos hidrocarbonado
12	47.23	espatulenol	1144.04	9.78	Sesquiterpenos oxigenados
13	47.38	óxido de cariofileno	1430.10	12.23	Sesquiterpenos oxigenados

Monoterpenos: 62.44% hidrocarbonados, 9.61% oxigenados; Sesquiterpenos: 5.93% hidrocarbonados, 22.02% oxigenados.

7.2 Determinación del efecto anti-proliferativo de los aceites esenciales en *Streptococcus gordonii*

La enfermedad periodontal esta mediada por diversos patógenos que provocan la formación de placa en las piezas dentales, esta placa es un consorcio bacteriano y diversos estudios han revelado que los estreptococos, especialmente, *S. gordonii* es de los principales microorganismos Gram positivos presentes en la enfermedad periodontal (Jong *et al.*, 2014). Por lo anterior, es importante el uso de alternativas que ayuden a controlar la proliferación de este y otros microorganismos que puedan afectar la calidad de vida de las personas. En la Figura 6 se observa que el AEh de *E. tereticornis* a concentraciones desde 31.25 hasta 500 $\mu\text{g/mL}$ logra disminuir la proliferación de *S. gordonii* en cultivo, siendo las concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$ las más efectivas con porcentajes de inhibición de 84% y 96%,

respectivamente. El AEf de *E. tereticornis* no presentó porcentajes de inhibición en la proliferación del microorganismo mayores a 55 % en ninguno de los tratamientos donde se utilizó. Se hace mención que son diversas las especies que presentan actividad biológica en contra de agentes odontopatógenos de gran importancia, *E. globulus* es una de estas especies vegetales, miembro del mismo género que *E. tereticornis*. De la gran cantidad de compuestos que se han sometido a pruebas antimicrobianas contra bacterias odontopatógenas, se hace mención a moléculas como el α -pineno, β -pineno, mirceno y β -carofileno (Lamprini *et al.*, 2016). Estos compuestos se encuentran presentes tanto en AEh como en AEf, aunque en diferentes concentraciones, y esto se puede relacionar con la actividad de ambos. El mejor efecto antiproliferativo del AEh puede deberse a que los compuestos ya mencionados se encuentran en mayor cantidad. También se mencionan como agentes antimicrobianos a otros terpenos como el cineol, cimeno y terpenil (Chandra *et al.*, 2014) compuestos que también están presentes en los AE utilizados en este trabajo.

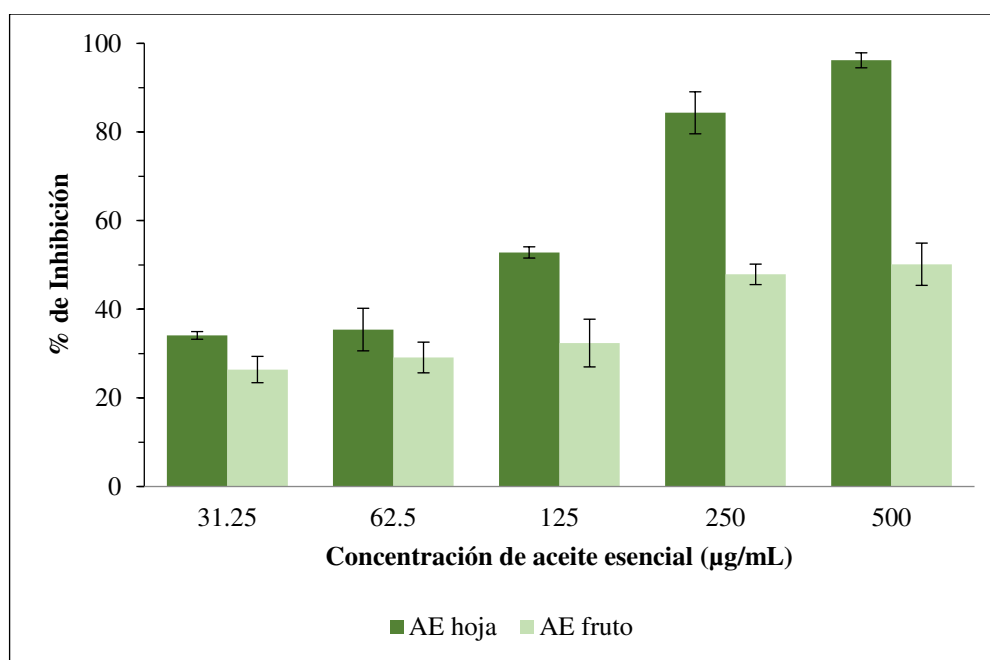


Figura 6. Inhibición de la proliferación de *S. gordonii* de AE de *E. tereticornis* de hoja y de fruto por el método de micro dilución ($\bar{x} \pm DS$, n = 3).

7.3 Determinación de capacidad antioxidante de los aceites esenciales por la técnica de captación de radical DPPH

En años recientes se han adoptado múltiples ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante *in vitro* de componentes vegetales, entre ellos, aceites esenciales (AE). Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar.

Como puede observarse en la Figura 7, la capacidad de captación del radical DPPH de los AE de *E. tereticornis* difiere entre la hoja (AEh) y el fruto (AEf). El AEf presentó ligeramente una mayor capacidad antioxidante que el AEh. Esto coincide según lo reportado en un estudio realizado por Bhagat *et al.* (2016), en el que se evidenció como las diferentes partes del eucalipto presentan una capacidad antioxidante desigual. En el estudio se analizaron diferentes partes del eucalipto (tallo, hoja y fruto) en su capacidad antioxidante, encontrando que el fruto presentaba una mayor capacidad para captar radicales DPPH, seguido de la hoja y finalmente el tallo. Esto era atribuido a la diferente composición química de cada parte de la planta estudiada. En el caso del fruto, el componente mayoritario era el eucaliptol (1,8-cineol), mientras que, para la hoja y el tallo, el componente mayoritario era el α -pineno.

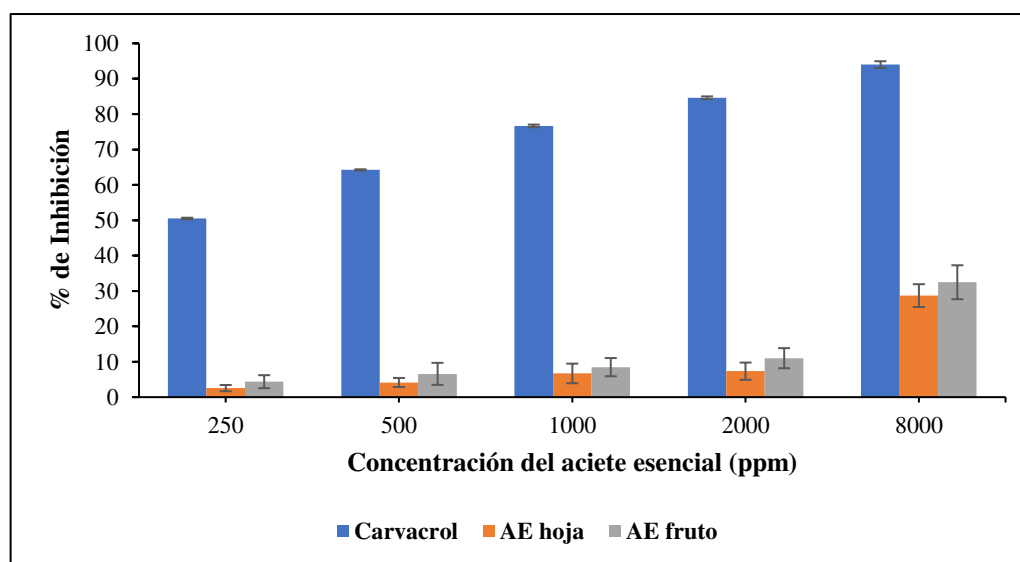


Figura 7. Comparación del porcentaje de inhibición del radical DPPH de AE de *E. tereticornis* de hoja, fruto y carvacrol como antioxidante de referencia (control) ($\bar{x} \pm DS$, n = 3).

De igual manera, en la Figura 7, es posible observar como la capacidad antioxidante del AE de *E. tereticornis*, comparada con el control (carvacrol) a las mismas concentraciones, es significativamente menor. Estos resultados coinciden con los reportados por Hee Lee (2016), quien evaluó la capacidad antioxidante de 4 especies diferentes de eucalipto usando como referencia a la vitamina C. Se encontró que el IC₅₀ de la vitamina C (2.4 µg/mL) fue menor que las especies de eucalipto evaluadas (36,500 – 301,200 µg/mL). De igual manera se ha caracterizado y determinado la capacidad antioxidante del AE de eucalipto proveniente de Algeria, encontrándose que el AE presentaba una actividad mucho menor (IC₅₀ 33.33 mg/mL) en comparación al BHT, antioxidante de referencia (0.033 mg/mL) (Harkat-Madouri *et al.*, 2015). Es importante remarcar que, compuestos puros como los estándares ensayados en este y otros estudios (i.e. vitamina C, carvacrol), en general presentan actividades antioxidantes mejores que los AE, ya que estos son una mezcla de compuestos, los cuales no necesariamente todos presentan esta actividad biológica. Lo anterior no es del todo negativo debido a que aquellos compuestos sin actividad antioxidante pueden presentar otras actividades biológicas de interés, como por ejemplo antimicrobiana o antiinflamatoria (Rantzsch *et al.*, 2009; Bagora *et al.*, 2014; Abdul *et al.*, 2015). Esto resulta interesante, ya que el mismo aceite puede contribuir a través de diferentes efectos a prevenir o contener las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad periodontal.

7.4 Determinación de polifenoles totales en los aceites esenciales

La determinación del contenido de polifenoles totales presente en los productos naturales permite establecer la correlación entre los compuestos contenidos en un extracto o AE y las bioactividades que presentan (i.e. antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria). En este trabajo se llevó a cabo la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Tabla VI). De manera general, pudo observarse que el AEh de *E. tereticornis* presenta un mayor contenido de estos compuestos en comparación con el AEf. Este resultado puede atribuirse a que, de manera natural, los compuestos activos en las plantas pueden localizarse en mayor o menor cantidad en los diferentes órganos (Singh *et al.*, 2012). Particularmente, Singh y col. (2009) demostraron que el AEh de la especie *E. tereticornis* muestra una alta capacidad antioxidante, debido a la presencia de una cantidad importante de monoterpenos,

principalmente, 1,8-cineol y α -pineno, los cuales también se encuentran presentes en los AE del presente estudio, con un 9.0 y 1.8%, respectivamente. Por su parte, extractos acuosos obtenidos a partir de la especie *E. camadulensis* mostraron un contenido de polifenoles totales de 364.1 ± 8.2 mg/g de planta, valor por encima de los obtenidos a partir de *E. tereticornis*, indicando que el tipo de producto natural obtenido de la planta (extracto o aceite) influye de manera significativa en la obtención y, por lo tanto, en la concentración de los polifenoles (Singab *et al.*, 2011).

Tabla VI. Determinación de polifenoles¹ y flavonoides totales² en los aceites esenciales de *E. tereticornis*

COMPUESTO (mg/gAE)	Aceite Esencial	
	Hoja	Fruto
Polifenoles totales	17.94 ± 0.30	14.96 ± 0.03
Flavonoides totales	0.468 ± 0.014	0.491 0.009

¹ Técnica de Folin-Ciocalteu, ² Garrido *et al.*, 2013. ($\bar{x} \pm DS$, n = 3).

Específicamente, para los AE de nuestro estudio, si bien el contenido de polifenoles totales en la hoja (AEh) fue mayor, se obtuvo una capacidad antioxidante ligeramente superior en el fruto (AEf). Esta diferencia puede explicarse debido a que la determinación del contenido de compuestos fenólicos engloba todas aquellas moléculas que en su estructura química presentan uno o más anillos de benceno y uno o más grupos hidroxilados. Este parámetro no determina, por tanto, la capacidad antioxidante total, ya que algunos componentes incluidos como compuestos fenólicos pueden tener una baja actividad antioxidante y presentar la estructura antes mencionada. Por otro lado, los diferentes compuestos fenólicos en la hoja pueden pertenecer a un grupo específico con alta actividad antioxidante, por ejemplo, flavonoides.

7.5 Determinación de flavonoides totales en los aceites esenciales

Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen polifenólico que poseen un grupo cetona y normalmente son pigmentos de coloración amarilla. Una de las actividades más importantes que se les ha atribuido a los flavonoides es la antimicrobiana, por lo que su determinación en productos naturales (i.e. extractos y AE) es ampliamente utilizada para correlacionarse con su bioactividad (De la Rosa *et al.*, 2012).

Una vez que se determinaron los polifenoles totales presentes en los AE de *E. tereticornis*, se realizó la cuantificación de flavonoides totales (Tabla VI). La presencia de flavonoides totales fue similar en ambos tipos de AE, registrando un valor de 0.468 ± 0.014 y 0.491 ± 0.009 mg/g de planta para el AEh y AEF, respectivamente. Estos valores son bajos en comparación con los obtenidos a partir de extractos de otras especies de *Eucalyptus* e inclusive, otras plantas, ya que, generalmente, los flavonoides se localizan en hojas o frutos que exhiben coloración en el rango del amarillo; en particular, éstos se extraen en mayor concentración a partir de extractos del espécimen (Miranda *et al.*, 2016). Sin embargo, su poca presencia no limitó la actividad antimicrobiana de los AE, probablemente debido a que este tipo de compuestos fueron los responsables de dicha actividad.

7.6 Determinación del efecto antiinflamatorio *in vitro* con albúmina sérica bovina

En una primera aproximación, para evaluar el efecto antiinflamatorio o proinflamatorio de los AE de *E. tereticornis*, se realizó un estudio *in vitro* utilizando como modelo BSA. Según las especificaciones de este ensayo, si un PN genera un porcentaje de efecto antiinflamatorio superior al 20%, puede considerarse que posee dicha actividad y podría llegar a ser útil dentro del área farmacéutica (Williams *et al.*, 2008). Tomando en cuenta lo anterior, ambos AE podrían ser considerados como potenciales agentes antiinflamatorios, ya que aún a bajas concentraciones (25 a 100 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 8), demostraron brindar niveles superiores de protección a la albúmina con respecto al control utilizado, el diclofenaco sódico.

Adicionalmente, se observó que no existe inducción inflamatoria por parte del AEH y el AEF en el rango de concentraciones analizado, debido a que ninguno de los AE generó valores

negativos para el efecto antiinflamatorio, es decir un efecto contrario sobre la BSA. Por otra parte, estos resultados también pueden ser interpretados desde un punto de vista toxicológico, al tomar en cuenta que la inflamación es considerada uno de los primeros y más comunes mecanismos de respuesta ante la detección de un elemento toxico o dañino para el organismo (Sakat *et al.*, 2009). Considerando lo anterior, es posible inferir que ambos aceites poseen la capacidad de generar un efecto benéfico sin llegar a propiciar condiciones nocivas, al menos dentro de un sistema *in vitro*.

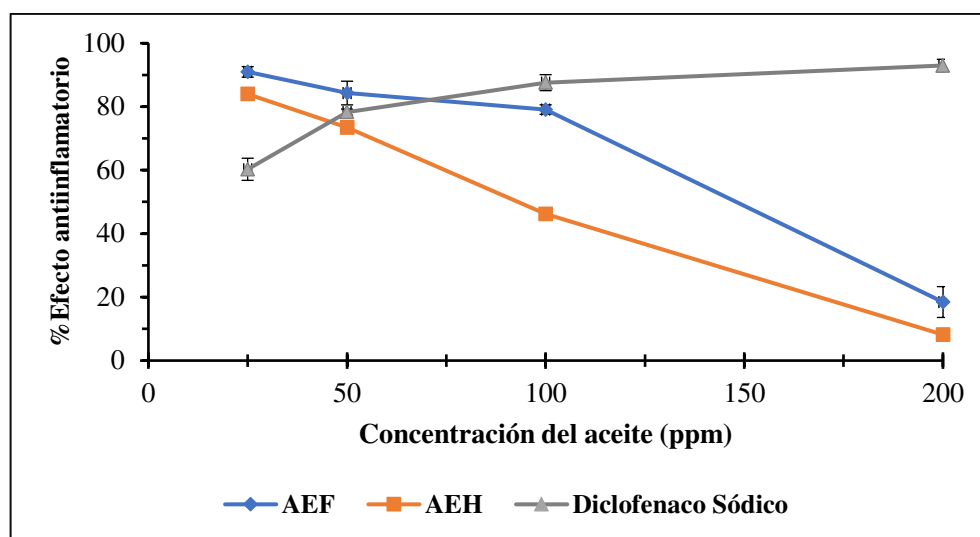


Figura 8. Determinación del efecto antiinflamatorio sobre BSA *in vitro* para los aceites esenciales obtenidos a partir de *E. tereticornis* ($\bar{x} \pm DS$; $n = 3$).

Ahora bien, el comportamiento antes mencionado, puede asociarse a la composición química de los AE. Este fenómeno se le atribuye a la naturaleza de los AE y sus componentes, en este caso a cierto tipo de terpenos, los cuales son compuestos producidos a partir del metabolismo secundario de la planta y a los que se les adjudica la actividad biológica de interés en la mayoría de los AE. Particularmente, el alto contenido de 1,8-cineol, también conocido como eucaliptol, dentro de los AE obtenidos a partir de *E. tereticornis* pudo ser el responsable de la actividad antiinflamatoria, ya que previamente se le ha asociado dicho efecto. Si bien el mecanismo de acción del eucaliptol aún no se ha elucidado por completo, existe evidencia que muestra como el compuesto interfiere en la ruta metabólica del ácido araquidónico e inhibe la producción de prostaglandinas y tromboxanos, de una forma similar a como actúa al ácido acetilsalicílico y otros fármacos antiinflamatorios (Santos & Rao, 2000).

Correlacionando lo anterior con los resultados obtenidos en este trabajo, es precisamente debido a esta característica química que se aprecia una diferencia entre el comportamiento individual de ambos aceites, los cuales generaron diferentes porcentajes de actividad biológica. El AEF mostró una mayor actividad antiinflamatoria, posiblemente al contener mayor concentración de compuestos antiinflamatorios (p.e. el eucaliptol). Hoy en día existe evidencia relacionada a que la presencia y concentración de estos compuestos difiere incluso entre especies de un mismo género. Así mismo, es posible encontrar diferencia en su concentración, dependiendo del sitio de donde se haya extraído el aceite, por lo que presentan funciones ecológicas y fisiológicas específicas en cada parte de la planta (García & Carril, 2011).

7.7 Evaluación del efecto de los aceites esenciales en la expresión génica de citocinas proinflamatorias en monocitos de sangre periférica

El proceso inflamatorio es un componente de la inmunidad innata. Sin embargo, una excesiva producción de mediadores proinflamatorios y la consecuente atracción de leucocitos a sitios donde se presenta una infección o presencia de un cuerpo extraño, a menudo produce un daño tisular. Por ello, la inflamación desempeña un papel importante en la fisiopatología de diversas enfermedades agudas y crónicas como artritis reumatoide, infecciones bacterianas y periodontitis (Harokopakis *et al.*, 2006). Con la finalidad de conocer si los AE de *E. tereticornis* en estudio, son candidatos para su uso como fuente natural de agentes antiinflamatorios, estos aceites se probaron en un cultivo de células humanas del sistema inmune aisladas de sangre periférica y estimuladas con lipopolisacárido (LPS). Como se puede observar en la Figura 9 A), B) y C), la aplicación de LPS al cultivo de células logró incrementar los niveles de expresión de los genes que codifican para IL1 β , IL8 y TNF α . Actualmente, es bien sabido que el LPS es un estimulador del proceso inflamatorio, de manera que la presencia de esta endotoxina promueve la producción de citocinas proinflamatorias como las antes mencionadas (Ji-Nan *et al.*, 2011). En los resultados se puede observar que el AEh y AEF son capaces de reducir la producción de RNAm de IL1 β , IL8 y TNF α , aun cuando los monocitos de sangre periférica en cultivo son estimulados con LPS. Si bien los niveles de expresión de los genes se ven sobre expresados, esto sucede a un valor menor en comparación al control con LPS, demostrando así que los AE utilizados revierten el efecto del LPS sobre los monocitos en cultivo a las diferentes concentraciones probadas. Esto hace suponer un efecto antiinflamatorio de los AE, ya que la

cascada de señalización intracelular en la inflamación se inicia por la interacción entre el inmunógeno y el receptor de reconocimiento de este mismo, lo cual permite la producción de los mediadores proinflamatorios primarios que incluyen a IL1 β y TNF α , así como otras citocinas y quimiocinas que promueven la activación del complemento y la respuesta inmune en fase aguda (Yong *et al.*, 2018).

En particular, se ha reportado que el AE de *E. globulus*, con su componente dominante eucaliptol, reduce significativamente la producción de mediadores proinflamatorios TNF- α e IL-1 β en un modelo de inflamación en la línea celular MH-S, macrófagos alveolares de pulmón (Yadav & Chandra, 2017). Como ya se hizo mención, el eucaliptol se encuentra presente en los AE de hoja y fruto utilizados en este trabajo. Otro estudio semejante reporta que *Eucalyptus spp* posee la capacidad de inhibir la producción de TNF α y óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7 (macrófagos) estimulados con INF γ y LPS a una concentración de 10 μ g/mL (Most *et al.*, 2016).

Es importante señalar que los resultados obtenidos en el ensayo con BSA coinciden con el ensayo celular de niveles de expresión génica de citosinas proinflamatorias. En el caso del primer ensayo, se demostró un efecto antiinflamatorio sobre la BSA, mientras que en el segundo se determinó una mejor expresión de los genes asociados a mediadores proinflamatorios primarios (IL-1 β y TNF- α).

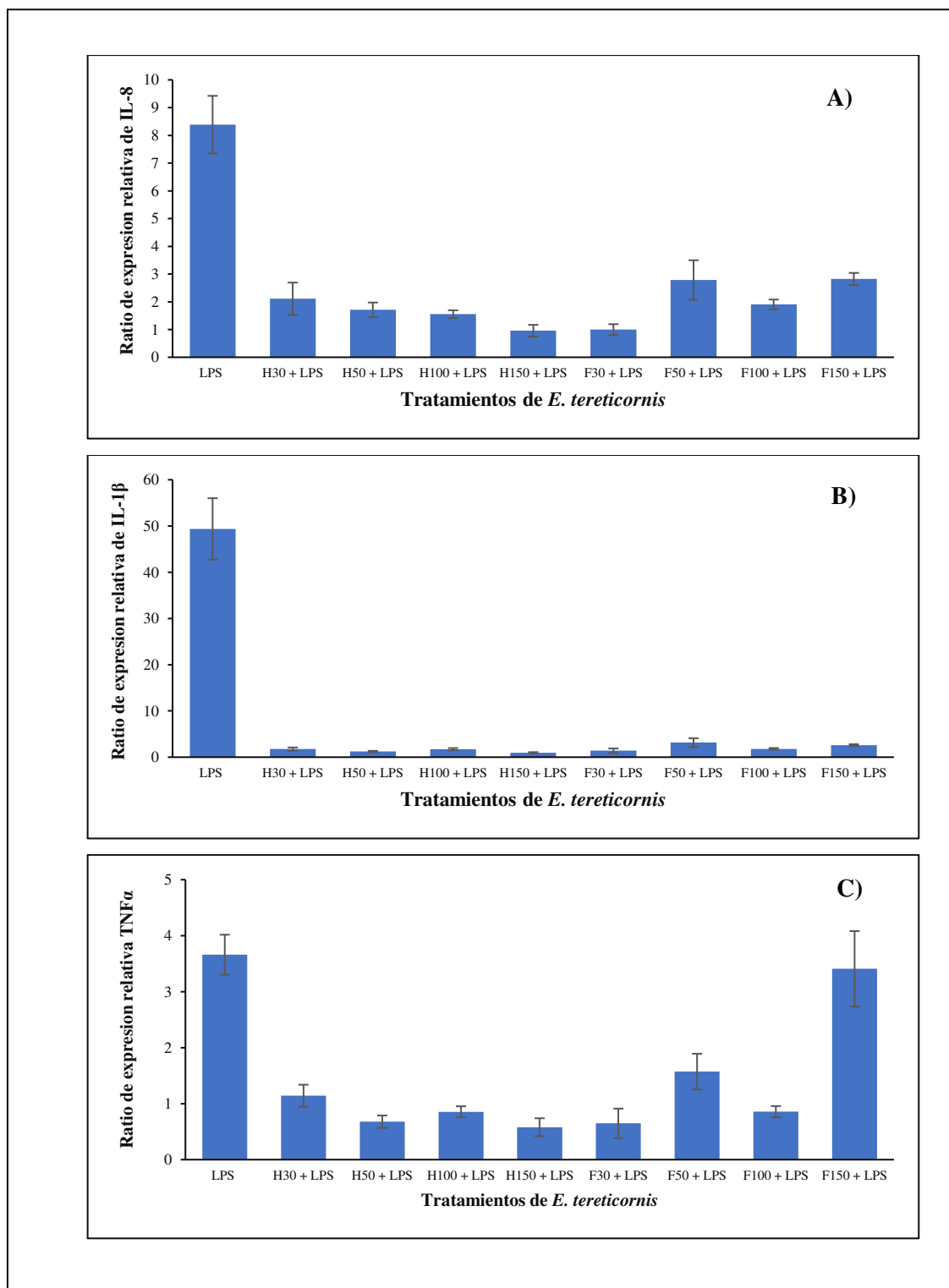


Figura 9. Efecto de AEh y AEf de *E. tereticornis* en la expresión del gen que codifica para. A) IL-8; B) IL-1β; C) TNF-α. LPS (lipopolisacárido a 10 µg/mL), H30 (AEh a 30 µg/mL), H50 (AEh a 50 µg/mL), H100 (AEh a 100 µg/mL), H150 (AEh a 150 µg/mL), F30 (AEf a 30 µg/mL), F50 (AEf a 50 µg/mL), F100 (AEf a 100 µg/mL), F150 (AEf a 150 µg/mL). ($\bar{x} \pm DS$; $n = 3$).

7.8 Determinación de citotoxicidad *in vitro* por hemólisis eritrocitaria inducida

Uno de los aspectos más importantes a considerar para el empleo de los productos naturales como agentes terapéuticos son los índices de toxicidad que puedan presentar. La evaluación de este tipo de parámetros permite establecer si el producto natural es apto para su aplicación en humanos. Particularmente, el ensayo de citotoxicidad por hemólisis eritrocitaria inducida es una prueba *in vitro*, económica y rápida, que puede servir como discriminante, antes de pasar a pruebas *in vivo* más complejas.

Los resultados obtenidos para los AE de *E. tereticornis* se muestran en la Figura 10. De manera general, se pudo observar que ambos aceites presentaron una relación directamente proporcional entre la concentración de AE evaluada y el efecto hemolítico de los mismos. Para ambos aceites, es a partir de los 50 $\mu\text{g/mL}$ que se presentó un incremento en la citotoxicidad. Particularmente, el AEh presentó un aumento gradual en la citotoxicidad, produciendo el 100% de hemólisis a partir de los 500 $\mu\text{g/mL}$, en AEf se incrementó significativamente a partir de los 150 $\mu\text{g/mL}$, alcanzando valores cercanos al 100% de hemólisis a los 300 $\mu\text{g/mL}$. En conjunto, estos resultados establecen de manera preliminar que el AEf de *E. tereticornis* presentó toxicidad a concentraciones menores que las de AEh.

Los parámetros de citotoxicidad inducidos por los AE pueden correlacionarse con la diferencia tanto en la composición, como en la cantidad de los compuestos químicos presentes en los aceites. En un estudio similar, Mendanha y col. (2013) señalaron que el efecto de diversos terpenos sobre los RBC es diferente y depende de la concentración del compuesto presente en la prueba. Así, el terpeno nerolidol presentó mayor índice de hemólisis a concentraciones más bajas comparado con el 1,8-cineol. En este contexto, considerando el perfil químico de los dos AE analizados, en el AEh se identificó la presencia de 1,8-cineol, mientras que en el AEf no se detectó (Figura 4). Si se correlaciona con el índice hemolítico mostrado por el AE, a pesar de presentar una mayor concentración de dicho compuesto (1,8-cineol), el AEh muestra un efecto citotóxico progresivo sobre los RBC. Por el contrario, el AEf, que muestra un aumento más significativo en el índice hemolítico, posiblemente, contiene una mayor concentración de compuestos tóxicos (p.e. el nerolidol).

Existen estudios en los que se ha establecido que cuando se prueban grupos de compuestos químicos aislados a partir de especies de *Eucalyptus*, particularmente, monoterpenos y sesquiterpenos, son los compuestos con características sesquiterpenoides los que provocan un mayor daño a los RBC (Agar *et al.*, 1998). Considerando que el AEF presentaba un mayor índice de compuestos sesquiterpenoides (33%), era de esperarse que mostrara un mayor efecto citotóxico sobre los RBC (Figura 10). Cabe mencionar que los resultados de citotoxicidad obtenidos por hemólisis inducida de RBC deben corroborarse con otro tipo de ensayos (p.e. cultivo celular, rebanadas de tejido o *in vivo*) para asegurar o descartar el empleo terapéutico de este tipo de productos naturales en el humano.

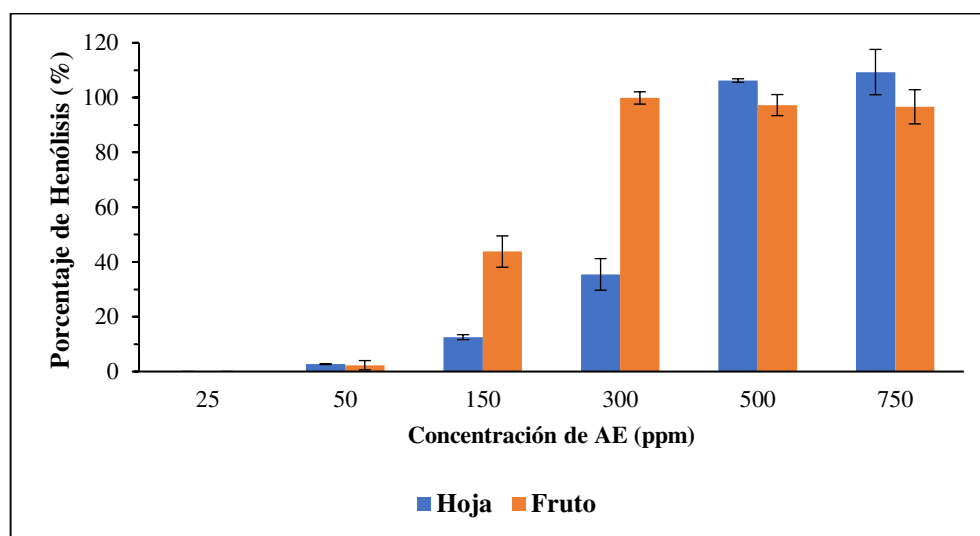


Figura 10. Determinación de citotoxicidad *in vitro* por hemólisis inducida de eritrocitos para los aceites esenciales obtenidos a partir de *E. tereticornis* ($\bar{x} \pm DS$; $n = 3$).

7.9 Determinación de toxicidad por bioensayo con *Artemia salina*

Como ya se mencionó, no sólo es importante estudiar la toxicidad que presentan los productos naturales para evaluar su aplicación potencial en un tratamiento determinado, sino también correlacionar los resultados de diversas pruebas para inferir los efectos nocivos o secundarios que los productos naturales pudieran presentar. En este contexto, el bioensayo de toxicidad con *A. salina* fue empleado para establecer el perfil toxicológico del AEh y AEF obtenidos a partir de *E. tereticornis* (Mentor *et al.*, 2014). La Figura 11 muestra las CL₅₀ para ambos aceites.

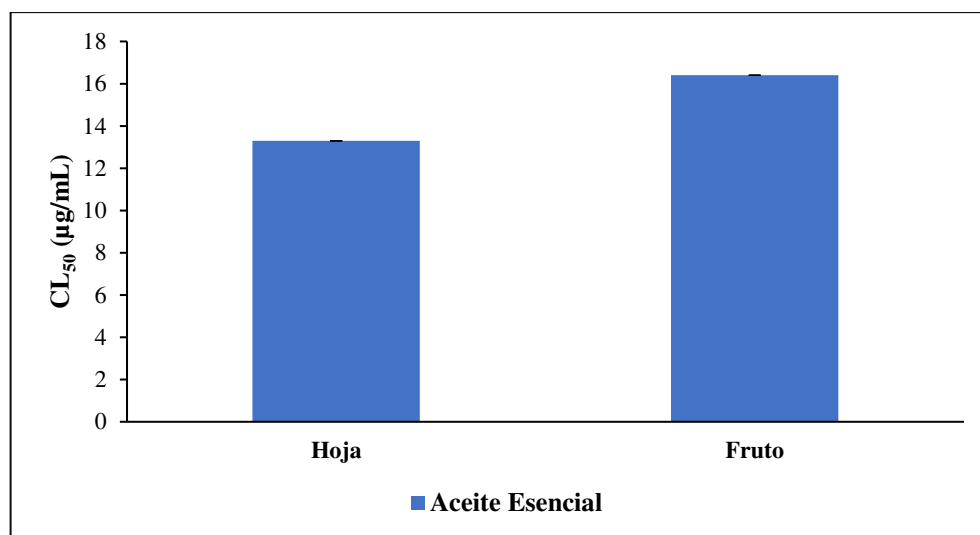


Figura 11. Determinación de CL₅₀ por bioensayo con *A. salina* para los aceites esenciales obtenidos a partir de *E. tereticornis*.

De manera general, en el estudio pudo observarse que los dos AE analizados muestran un valor de CL₅₀ bajo, de 13.30 y 16.40, para el AEh y el AEf, respectivamente. Tomando la clasificación de índice de toxicidad empleada por Fernández-Calienes y col. (2009), tanto el AEh como el AEf son considerados “muy tóxicos” ($10 < CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Como se ha descrito con anterioridad, es la composición química de los AE el principal factor responsable de esta actividad toxica. Como se sabe, los AE son una mezcla compleja tanto de compuestos bioactivos, benéficos o perjudiciales para diversos organismos (Vidotto *et al.*, 2013).

Sin embargo, dos aspectos importantes se deben de tomar en cuenta antes de considerar si un producto natural debe ser discriminado para su uso por el índice toxicológico que pudiera presentar en los ensayos de laboratorio. Por una parte, si bien es cierto que el bioensayo con *A. salina* ha mostrado una buena correlación con otro tipo de estudios de toxicidad, el resultado obtenido no puede interpretarse como definitivo. En este contexto, es necesaria la realización de pruebas adjuntas (sobre todo modelos *in vivo* o *ex vivo* más complejos) que confirmen o descarten la toxicidad del producto natural analizado. Por otro lado, es importante recordar que la toxicidad inicial que pueda presentar un producto natural estará determinada por la dosis o cantidad que se administre al organismo, así como por el período de exposición a dicho agente. Ejemplo claro de esto son los fármacos actuales que se utilizan a dosis y durante los períodos,

previamente establecidos, en base al índice toxicológico que muestran en ensayos de laboratorio. Adicionalmente, considerando los avances en tecnología farmacéutica, cuando un producto natural, tales como los extractos o AE, inicialmente muestran un índice de toxicidad alto en pruebas de laboratorio, pueden ser empleados en formulaciones que disminuyan las barreras (p.e. toxicológicas) que estos pudieran presentar. Particularmente, la micro y nanoencapsulación de los productos naturales, en sistemas de liberación controlada, han mostrado mejorar significativamente la toxicidad que presentan dichos productos en ensayos de laboratorio (Armendáriz *et al.*, 2016).

8 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se valoró el potencial del aceite esencial de *E. tereticornis* como candidato en el tratamiento de enfermedades periodontales.

- ✓ En la caracterización química del aceite esencial de *E. tereticornis* se determinó la presencia de: 1,8-cinenol, α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, mirceno (CG-EM) con actividad biológica, previamente reportada.
- ✓ El aceite esencial de *E. tereticornis* presentó actividad antimicrobiana contra *S. gordonii*, a una concentración relativamente alta (500 $\mu\text{g/mL}$).
- ✓ El aceite esencial de hoja y fruto de *E. tereticornis* presentó una CL_{50} de 13.30 y 16.40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente sobre de *A. salina*, considerándose tóxicos.
- ✓ El aceite esencial de hoja y fruto de *E. tereticornis* mostró actividad antioxidante baja.
- ✓ El aceite esencial de *E. tereticornis* presentó actividad antiinflamatoria relevante, en un modelo *in vitro* con BSA y confirmada en un modelo celular con monocitos humanos que inhibió la producción de mediadores proinflamatorios (TNF- α e IL-1 β), esta es de suma importancia ya las enfermedades periodontales inician con un proceso inflamatorio (gingivitis) hasta llevar a la destrucción de tejidos.

En conclusión, se pudo demostrar que el aceite esencial de *E. tereticornis* presenta potencial para ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades periodontales, destacándose su actividad antiinflamatoria y en menor medida, la antioxidante y antimicrobiana.

9 PERSPECTIVAS

Se recomienda continuar con la investigación de *E. tereticornis*, particularmente, en el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad biológica. Así mismo, en la evaluación de la actividad biológica y toxicidad, en modelos *in vitro e in vivo*, de los principios activos de *E. tereticornis*. También, sería recomendable formular a los AE en alguna forma de dosificación que haga viable su aplicación en el humano, por ejemplo, incorporándolos en nanopartículas poliméricas.

10 BIBLIOGRAFÍA

Allaker R. & Douglas C. 2009. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33(1): 8-13.

Abdul G., Muhammad Y., Shumaila K., Shagufta K., Jalal F., Bushra M., Sadaf S., Naila R., Aftab A., Saba I., Abdul J. 2015. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of essential oils extracted from seven *Eucalyptus* species. *Molecules MDPI*. 20(11): 20487-20498.

Adams R. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4a ed. EUA: *Allured Publishing Corporation*. p 804.

Agar N. S., Ogawa E., O'Callaghan S. S., Hume I. D. 1998. The effect of eucalyptus oils on the erythrocytes of koalas. *Comparative Haematology International*. 8(1): 225-229.

Aguilar V. 2014. Enfermedad periodontal y climaterio. *MEDISAN*. 18(2): 151-156.

Al-Maskri A., Hanif M., Al-Maskari M., Abraham A., Al-Sabahi J., Al-Mantheri. 2011. Essential oil from *Ocimum basilicum* (*Omani Basil*): a desert crop. *Natural Product Communications* 6(10): 1487-1490.

Ardila C. 2016. Efecto inmunomodulador antiinflamatorio de la moxifloxacina como coadyuvante en la terapia periodontal. *Archivo Médico de Camagüey*. 20(4): 444-451.

Armendáriz B., Álvarez R., Galindo S. 2016. Cap. 12 Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados, en *Investigación en Plantas de Importancia Médica*. Eds. Rivas-Morales C., Oranday-Cárdenas M. A. & Verde-Star M. J. España: *OmniaScience*. pp 411-436.

Awol M., Berhanu Y., Alemnesh T., Solomon T. 2016. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology*. 10(1): 1-8.

Bacallao L., Rojo D., García L. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 21(3): 214-6.

Baenhi P. & Takeuchi Y. 2003. Antiplaque agents in the prevention of biofilm associated oral diseases. *Journal of Oral Diseases*. 9(1):23-29.

Bagora B., Imael H., Charlemagne G., Roger N., Albert Y., Laurent M., Gilles F., Nikema J., Lobaccaro J., Simpore J. 2014. Chemical composition, antioxidant, antiinflammatory and antiproliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *PLOS One*. 9(3): 921.

Bascones Martínez A. & Legida Arce B. 2000. Tomo III, Sec. XXVII, Cap. 13 Antibióticos y antimicrobianos en periodoncia, en *Tratado de Odontología*. Ed. Bascones A., 3ª ed. España: Ediciones Avances Médico-Dentales, S.L. pp 3447-3453.

Bascones A., Morante M., Perea S. 2002. Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Periodoncia Implantología y Rehabilitación Oral*. 14(3): 101-114.

Bellaiza C. 2013. Antisépticos y Antibióticos en Periodoncia (I). *Estomatología*. 1(1). Disponible en: <http://estomatologia.univalle.edu.co/index.php/estomatol/article/view/22>. Fecha de acceso: 24 may. 2018.

Betancourth M., Arce R., Botero J., Jaramillo, A. 2006. Microorganismos inusuales en surcos y bolsas periodontales. *Revista Colombia Médica*. 37(1): 124-136.

Bhagat M., Gupta S., Jamwal V., Sharma S., Kattal M. 2016. Comparative study on chemical profiling and antimicrobial properties of essential oils from different parts of *Eucalyptus lanceolatus*. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 15(1): 425–432.

Bossou A., Mangelinckx S., Yedomonhan H., Akogbeto M., De Kimpe N., Avlessi F., Sohounhloue D. 2013. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasites & Vectors*. 6(1): 337.

Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27(9): 1017-1032.

Byalakere R., Chandra S., Ramesh N., Shankarppa S., Rupesh T. 2015. Herbal extracts in oral health care – a review of the current scenario and its future needs. *Pharmacognosy Journal*. 9(18): 87-92.

Castillo R. 2017. Usos terapéuticos del Eucalipto: analgésico, antiinflamatorio, expectorante, antiviral y mucho más. Venezuela: *Universidad Agrícola, Biblioteca Virtual*. De: <http://universidadagricola.com> (20/05/2018).

Chandra S., Ramesh N., Rupal S., Roopesh T. 2014. Antimicrobial efficacy of the combinations of *Acacianilotica*, *Murraya koenigii L. sprengel*, *Eucalyptus hybrid* and *Psidium guajava* on primary plaque colonizers, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 5(4): 115-119.

Ciancio S. & Mariotti A. 2014. Cap. 47 Tratamiento antiinfeccioso, en *Periodontología Clínica de Carranza*. Eds. Newman G. M., Takei H. H., Klokkevold R. P., Carranza A. F., 11ª ed. China: AMOLCA. pp 776-788.

Claffey N., Polyzois I., Williams R. 2011. Historia de la relación oral-sistémica, en *Enfermedad Periodontal y Salud General: Una Guía para el Clínico*. Eds. Genco R. & Williams R., EU: *Professional Audience Communications Inc.* pp 42-54.

Cruz E. 2014. La moxifloxacina como coadyuvante en el tratamiento de las periodontitis. *Revista Clínica de Peridoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 7(3):200-208.

Dagli N., Dagli R., Mahmoud R., Baroudi K. 2015. Essential oils their therapeutic properties and implication in dentistry: a review. *Journal International Society of Preventive and Community Dentistry*. 5(5): 335-340.

De la Rosa T., Torres G., Camacho R., Calderón M., Herrera U., Osorio Y. 2012. Quantification of total flavonoids in the methanolic extract of *Glycine max* (Soybean) and larvicidal effect on *Aedes aegypti*. *Revista Colombiana de Ciencias de la Salud*. 1(1): 39-43.

Díaz L. 2016. Formulación de nanopartículas para su potencial uso odontológico. México: *Facultad de Odontología, UANL. Tesis de Licenciatura*.

Fajardo M., Rodríguez O., Hernández M., Mora N. 2016. Diabetes mellitus y enfermedad periodontal: aspectos fisiopatológicos actuales de su relación. *MEDISAN*. 20(6): 893 – 898.

Fernández-Calienes A., Mendiola J., Monzote L., García M., Sariago I., Acuña D., Scull R., Gutiérrez Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 61(3): 254-8.

Filomeno C., Barbosa L., Pereira J., Pinheiro A., Montanari R. 2016. The chemical diversity of *Eucalyptus spp* essential oil from plants grown in Brazil. *Chemical Biodiversity*. 13(1): 1656-1665.

Fiorellini P. J., Kao W. K. D., Kim D. M., Uzel N. G. 2014a. Cap. 1 Anatomía del periodonto, en *Periodontología Clínica de Carranza*. Eds. Newman G. M., Takei H. H., Klokkevold R. P., Carranza A. F., 11ª ed. China: AMOLCA. pp 12-52.

Fiorellini P. J., Kim D. M., Uzel G. N. 2014b. Cap. 7 Inflamación gingival, en *Periodontología Clínica de Carranza*. Eds. Newman G. M., Takei H. H., Klokkevold R. P., Carranza A. F., 11ª ed. China: AMOLCA. pp 107-113.

García A. & Carril E. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119–145.

Garcillan Izquierdo M. R. & Rioboo García R. 2000. Tomo II, Sec. XX, Cap. 3 Placa bacteriana coriódgena y placa bacteriana periodontopatógena, en *Tratado de Odontología*. Ed. Bascones A., 3ª ed. España: Ediciones Avances Médico-Dentales, S.L. pp 2207-2223.

Garrido G., Ortiz M., Pozo P. 2013. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis*. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 1(1): 30–38.

González F. 2016. Incremento en el control de la formación de placa empleando clorhexidina incorporada en nanopartículas poliméricas: estudio clínico y microbiológico. México: Facultad de medicina, UANL. *Tesis de Maestría*.

Gu Y. & Ryan M. 2011. Cap. 2 Presentación de la enfermedad periodontal: causas, patogénesis y características, en *Enfermedad Periodontal y Salud General: Una Guía para el Clínico*. Eds. Genco R. & Williams R. EU: *Professional Audience Communications Inc.* pp 5-23.

Granados D. & López G. 2007. Fitogeografía y ecología del género de *Eucalyptus*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(2): 143-156.

Hajer N., Mehrez R., Ahmed L., Florence M., Francois C., Manef A., Mohamed L., Jalloul B. 2011. *Eucalyptus oleosa* essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules MDPI*. 16(1): 1695-1709.

Hamidi M. R., Jovanova B. Panovska T. K. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina L.*) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60(1): 9-18.

Harkat-Madouri L., Asma B., Madani K., Bey-Ould Z., Rigou P., Grenier D., Boulekbache-Makhlouf L. 2015. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Industrial Crops and Products*. 78(1): 148-153.

Harokopakis E., Albzreh M., Haase E., Scannapieco F., Hajishengallis G. 2006. Inhibition of proinflammatory activities of major periodontal pathogens by aqueous extracts from elder flower (*Sambucus nigra*). *Journal of Periodontology*. 77(2): 271-279.

Hee Lee M. 2016. Chemical profile, antimicrobial and anti-oxidative activity of commercial eucalyptus and lavender essential oils and their applicability in cosmetics. *Indian Journal of Science and Technology*. 9(1): 1-46.

Herane M. 2014. Enfermedad periodontal y embarazo. *Revista Médica Clínica Condes*. 25(6): 936-943.

Hernández T. 2016. Estudio clínico de la actividad antiplaca de la clorhexidina incorporada a nanopartículas poliméricas. México: *Facultad de Odontología, UANL. Tesis de Maestría*.

Hinrichs J. & Novak J. 2014. Cap. 4 Clasificación de las enfermedades y condiciones que afectan el periodonto, en *Periodontología Clínica de Carranza*. Eds. Newman G. M., Takei H. H., Klokkevold R. P., Carranza A. F., 11ª ed. China: AMOLCA. pp 60-80.

Huey C., Ya-Chi H., Jia-Min L., Tzu-Yun C., Chen-Lung H., Tsong-Min C. 2015. Investigation of the antimelanogenic and antioxidant characteristics of *Eucalyptus camaldulensis* flower essential oils and determination of its chemical composition. *International Journal Molecules Science*. 16(5): 10470-10490.

Jaramillo A. 2013. Asociación entre enfermedad periodontal y niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos. *Revista Colombia Médica*. 44(2). Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/1123/2025>. Fecha de acceso: 12 mar. 2018.

Ji-Nan D., Yi Z., Lian-Mei Z., Yue-Min L., Wei Z., Li-Gong B., Qing-Long A., Yi-Dan L., Jun S., Di L. 2011. Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways. *PLOS One*. 6(7): 1-9.

Jong H., Jae-Kwan L., Heung-Sik U., Beom-Seok C., Si-Young L. 2014. A periodontitis associated multispecies model of an oral biofilm. *Journal of Periodontal & Implant Science* 44(1): 79-84.

Karbach J., Ebenezer S., Warnke P., Behrens E., Al-Nawas B. 2015. Antimicrobial effect of Australian antibacterial essential oils as alternative to common antiseptic solutions against clinically relevant oral pathogens. *Clinical Laboratory*. 61(2): 61-8.

Khazila C. 2015. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Journal Acta Trópica*. 154(1): 6-18.

Knezevic P., Aleksic V., Simin N., Svircev E., Petrovie A., Mimica N. 2016. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 178(1): 125-36.

- Lamprini K., AliAl-Ahmad1 A., Elmar H.** 2016. Natural antimicrobial sand oral microorganisms: a systematic reviewon herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers in Microbiology*. 6(1): 1529-117.
- Lindhe J., Karring T. Araújo, M.** 2011. Cap. 1 Anatomía de los tejidos periodontales, en *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Eds. Lindhe J., Lang N. P., Karring T., 5ª ed. España: *Médica Panamericana*. pp 3-49.
- Lucia A., Licastro S., Zerba E., González A., Masuh H.** 2009. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (*Diptera: Culicidae*) to the vapors of *Eucalyptus* EOs. *Bioresourse Tecnology*. 100(1): 6083-6087.
- Martínez Hernández R.** 2016. Cap. 5 Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales, en *Periodontología e Implantología*. Eds. Vargas Casillas A., Yáñez Ocampo B., Monteagudo Arrieta C., México: *Médica Panamericana*. pp 69-88.
- Mealey B. & Klokkevold P.** 2014. Cap. 28 Impacto de la infección periodontal sobre la salud sistémica, en *Periodontología Clínica de Carranza*. Eds. Newman G. M., Takei H. H., Klokkevold R. P., Carranza A. F., 11ª ed. China: *AMOLCA*. pp 503-536.
- Mendanha S., Moura S., Anjos J., Valadares M., Alonso A.** 2013. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in vitro*. 27(1): 323-329.
- Mentor R., Jovanova B., Kadifkova T.** 2014. Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (*Artemia Salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60(1): 9-18.
- Miranda I., Lima L., Quilhó T., Knapic S., Pereira H.** 2016. The bark of *Eucaluptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. *Industrial Crops and Products*. 82(1): 81-87.
- Mombelli A.** 2011. Cap. 42 Antibióticos en el tratamiento periodontal, en *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Eds. Lindhe J., Lang N. P., Karring T., España: *Médica Panamericana*. pp 882-897.

Monteagudo Arrieta C. 2014. Cap. 4 Patogenia de la enfermedad periodontal, en *Periodontología e Implantología*. Eds. Vargas Casillas A., Yáñez Ocampo B., Monteagudo Arrieta C., México: *Médica Panamericana*. pp 55-65.

Most A., Ritesh R., Karren D., Frances B., Gerald M. 2016. Medicinal plants of the australian aboriginal dharawal people exhibiting anti-inflammatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 3(1): 1-8.

Mulyaningsih S., Sporer F. 2011. Reichling J., Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical Biology*. 49(9): 893-899.

Nathan S. 2007. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (*Myrtaceae*) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (*Diptera: Culicidae*). *Bioresource Technology*. 98(1): 1856-1860.

Ocheng F., Bwanga F., Joloba D., Borg-Karlson A., Gustafsoon A. 2015. Antibacterial activities of extracts from Ugandan medicinal plants used for oral care. *Journal of Ethnopharmacology*. 155(1): 852-855.

Organización Mundial de la Salud. 2012. Salud bucodental. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/> Fecha de acceso: 03 jul. 2018.

Petrelli B., Ramírez M., Bascones M. 2003. Papel del estrés en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal. *Journal of Periodontology & Implant Science* 15(2): 77-86.

Philstrom B., Michalowicz B., Johnson N. 2005. Periodontal diseases. *Lancet*. 366(9499): 1809-20.

Raho G. & Bernali M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac Journal Tropical Biomedicine*. 2(9): 739-742.

Rantzsch U., Vacca G., Dück R., Gillissen A. 2009. Antiinflammatory effects of myrtol standardized and other essential oils on alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Medical Research*. 14(4): 205-209.

Rasooli I. & Shayegh S. 2008. The effect of *Mentha spicata* y *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *International Journal Dent Hygiene*. 7(1): 196-203.

Rodríguez K., Amorim L., Díaz C., Morales D., Carneiro S., Carvalho F. 2015. *Syzygium cumini* (L.) skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*. 160(1): 32-40.

Safaei J. & Atefeh A. 2010. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* y *E. intertexta*. *Pharmacognosy Journal*. 6(23): 172-175.

Sakat S., Tupe P., Juvekar A. 2009. *In-vitro* anti-inflammatory activity of aqueous and methanol extracts of *Erythrina indica* Lam leaves. *Pharmacologyonline*. 3(1): 221-229.

Salem M., Ashmawy N., Elansary H., Settawy A. 2015. Chemotyping of diverse *Eucalyptus* species grown in Egypt and antioxidant and antibacterial activities of its respective essential oils. *Natural Products Research*. 29(7): 681-685.

Santos F. & Rao V. 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*. 14(4): 240-244.

Saranya S., Amitava M., Natarajan C. 2015. *Eucalyptus* oil nanoemulsion-impregnated chitosan film: antibacterial effects against a clinical pathogen, *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. *International Journal Nanomedicine*. 10(1): 67-75.

Serafino A., Sinibaldi P., Andreola F., Zonfrillo M., Mercuri L., Federici M., Rasi G., Garaci E., Pierimarchi P. 2008. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. *Journal BMC Immunology*. 9(17). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23746764/#!PO=82.7103>. Fecha de acceso: 23 mar. 2018.

Singab A., Ayoub N., Al-Sayed E., Martiskainen O., Sinkkonen J., Pihlaja K. 2011. Phenolic constituents of *Eucalyptus camadulensis* Denh, with potential antioxidant and cytotoxic activities. *Records of Natural Products*. 5(4): 271-280.

Singh H., Kaur S., Mittal S., Kumari S., Batish D., Kohli R. 2009. Characterization and antioxidant activity of essential oil from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(1): 6962-6966.

Singh H., Kaur S., Negi K., Kumari S., Saini V., Batish D., Kohli R. 2012. Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citridora* (lemon-scented Eucalypt; *Myrtaceae*) and its major constituents. *LTW - Food Science and Technology*. 48(1): 237-241.

SIVEPAB. 2015. Vigilando la salud bucal de los ciudadanos. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales. México: *Secretaría de Salud*. p 83.

Socransky S. & Haffanjee A. 2002. Dental biofilm: difficult therapeutic targets. *Periodontology*. 28(1): 12-55.

Socransky S. & Haffajee A. 2011. Cap. 9 Infecciones periodontales, en *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Eds. Lindhe J., Lang N. P., Karring T., 5^a ed. España: *Médica Panamericana*. pp 207-267.

Sung-Hoon L. 2013. Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral Streptococci. *Journal of Microbiology*. 51(4): 484-489.

Takarda K., Kimizuka R., Takahashi K., Okuda K. 2004. A comparison of antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbioloy Immunology*. 19(1): 61-64.

Tanaka M., Toe M., Nagata H., Ojima M., Kuboniwa M., Shimizu K., Osawa K., Shizukuishi S. 2010. Effect of eucalyptus-extract chewing gum on oral malodor: a double-masked, randomized trial. *Periodontology*. 81(11): 1564-1571.

Teughels W., Quirynen M., Jakubovics N. 2014. Cap. 23 Microbiología periodontal, en *Periodontología Clínica de Carranza*. Eds. Newman G. M., Takei H. H., Klokkevold R. P., Carranza A. F., 11ª ed. China: AMOLCA. pp 336-392.

Tsourounakis I., Palaiologou-Gallis A., Stoute D., Maney P., Lallier T. 2013. Effects of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. *Journal of Periodontology & Implant Science*. 84(1): 1211-1219.

Vargas Casillas A. & Arzate H. 2016. Cap. 1 Tejidos periodontales en salud, en *Periodontología e Implantología*. Eds. Vargas Casillas A., Yáñez Ocampo B., Monteagudo Arrieta C., México: Médica Panamericana. pp 3-26.

Vidotto C., Da Silva D., Patussi R., Brandao L., Tibúrcio J., Alves S., De Siqueira J. 2013. Brine shrimp lethality test as a biological model for preliminary selection of pediculicidal components from natural source. *Bioscience Journal*. 29(1): 255-263.

Villa, P. 2015. Enfoque salubrista de la enfermedad periodontal. *Revista Iberoamericana de Ciencia*. 2(4):180-187.

Vlachojannis C., Chrubasik-Hausmann S., Hellwig E., Al-Ahmad A. 2015. A preliminary investigation on the antimicrobial activity of *Listerine*®, its components, and of mixtures thereof. *Journal Phytotherapy Research*. 29(1): 1590-1594.

Wayne P. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. 9ª ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 32(2): 1-63.

Williams L., O'Connar A., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker J., Kraus W. 2008. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals. *West Indian Medical Journal*. 57(4): 327-331.

Wotton-Beard P., Aisling M., Lisa R. 2011. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion

measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*: 44(1): 217-224.

Yadav N. & Chandra H. 2017. Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by *eucalyptus* oil and its constituent 1,8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NFκB. *PLOS One*. 12(11): 1-19.

Young-il K., Shinsuke M., Shizuka H., Shan L., Tsuyoshi G., Chie O., Tomoya S., Haruya T., Daisuke S., Nobuyuki T., Teruo K. 2015. Tomato extract suppresses the production of proinflammatory mediators induced by interaction between adipocytes and macrophages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 79(1): 82-87.

Yong Q., Murray D., Fatema B., Kanchan V., Hassendrini N. 2018. Regulation of inflammatory mediator expression in bovine endometrial cells: effects of lipopolysaccharide, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. *Physiological Reports*. 6(9): 1-13.

Xue-Dong Z. & Wen-Yuan S. 2010. Human oral microbial community and dental plaque biofilm. *Journal*. 28(02): 115-118.

11 RESUMEN BIOGRÁFICO

Olivia Escamilla Gallegos

Candidata para el grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: VALORACIÓN BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis* PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA

Campo de estudio: Fitoquímica y Química de Productos Naturales

Datos Personales: Nacida en Nuevo Laredo Tamaulipas, hija de Inocencio Escamilla Soto y María Trinidad Gallegos Lara.

Formación Profesional: Egresada como Cirujano Dentista de la Universidad Nacional Autónoma de México en 1968.

Egresada de la Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Periodoncia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en 2012.

Experiencia Profesional: 50 años