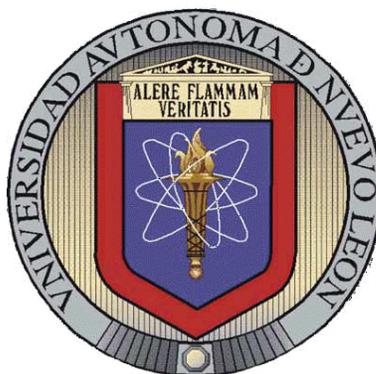


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**POTENCIAL ANTIBACTERIAL, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y  
MUTAGÉNICA DE *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y  
*Leucophyllum frutescens***

POR

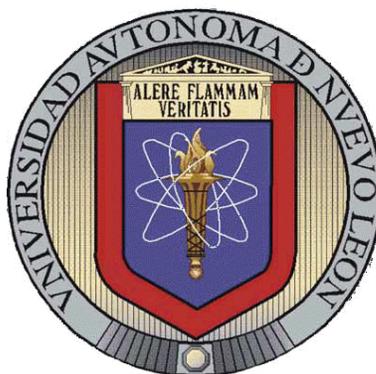
CD LAURA ELENA VILLARREAL GARCÍA MSP

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

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. MARZO 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**POTENCIAL ANTIBACTERIAL, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y  
MUTAGÉNICA DE *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y  
*Leucophyllum frutescens***

POR

CD LAURA ELENA VILLARREAL GARCÍA MSP

Que presenta como requisito parcial  
para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

San Nicolás de los Garza, N.L. Marzo 2014

POTENCIAL ANTIBACTERIAL, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y MUTAGÉNICA  
DE *Krameria ramossisima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y  
*Leucophyllum frutescens*

TESIS

Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

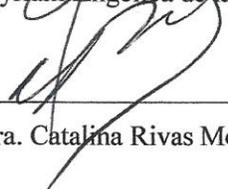
Por

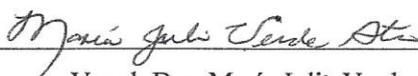
CD Laura Elena Villarreal García MSP

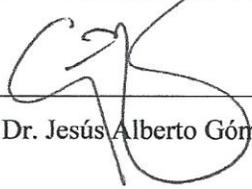
COMISIÓN DE TESIS:

  
\_\_\_\_\_  
Director interno: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

  
\_\_\_\_\_  
Secretario: Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos

  
\_\_\_\_\_  
Vocal: Dra. Catalina Rivas Morales

  
\_\_\_\_\_  
Vocal: Dra. María Julia Verde Star

  
\_\_\_\_\_  
Vocal: Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



POTENCIAL ANTIBACTERIAL, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y MUTAGÉNICA  
DE *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y  
*Leucophyllum frutescens*

Por

CD Laura Elena Villarreal García MSP

Que presenta como requisito parcial  
para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

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

Bajo la dirección de:

---

Dra. Azucena Oranday Cárdenas  
Director Interno

---

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos  
Director Externo

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño  
Co-director Externo

*Y a aquel que es poderoso para hacer todo mucho más  
abundantemente de lo que pedimos o entendemos,  
según el poder que obra en nosotros,  
a El sea la gloria en la iglesia y en Cristo Jesús  
por todas las generaciones,  
por los siglos de los siglos. Amén*

*Efesios 3:20-21*

## DEDICATORIA

Gracias a ti *Señor* por darme la fuerza y los dones suficientes para realizar mis sueños, me has dado más de lo que pude imaginar, gracias por tu amor que me acompaña todos los días y me inspira a ser mejor.

Mi profundo agradecimiento a mis padres: Juan Raúl y María Elena, quienes han sido un ejemplo de amor y perseverancia. Me han enseñado lo más valioso en mi vida que es el amor a Dios sobre todas las cosas y han sido mi modelo a seguir en cada decisión. Gracias por su apoyo incondicional y por sus oraciones.

A mi amado esposo Roberto, que ha sido mi compañero imprescindible, gracias por tu confianza y por compartir esta responsabilidad en el proyecto de vida que tenemos. Tu confianza en mí ha sido mi fortaleza, gracias por cuidar de nuestra hija en mis ausencias, eres parte de este logro sin tu apoyo no hubiera sido alcanzado.

A mis hijos: Naemi y Maximiliano, quienes han sido mi inspiración para ser la mejor mamá y ahora la mejor profesionista, quiero decirles que los amo con todo mi corazón, que deseo que siempre sean felices. El anhelo de mi alma es que tengan un encuentro personal con Cristo y que lo reconozcan en todos sus caminos, para que les vaya bien en TODO lo que hagan. Salmo 1:1-3.

Gracias a mis suegros: Marilú y Roberto, por su apoyo constante en mi familia, porque han sido una fuente constante de bendiciones para mi hogar, muchas gracias por todos sus cuidados.

A mis hermanos: Juan Luis, Daniela, Emilio, Lissette y Álvaro gracias por sus constantes muestras de apoyo e interés en cada uno de los proyectos que he iniciado, los quiero mucho.

A mis abuelitos: Matilde García, y Herminia Ramírez, Juan Villarreal y Josefa Ramos de Villarreal; gracias por ser quienes iniciaron estas hermosas familias, por ser líderes y fuentes de inspiración para cada uno de quienes formamos parte de estas ellas.

Gracias a mis tíos y primos quienes hemos sido criados en un amor fraterno, gracias por sus muestras de apoyo y cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a todos los miembros del comité de tesis: Dra. Azucena gracias por su valiosa dirección, por su paciencia y comprensión a lo largo de estos años, le agradezco en especial su motivación para seguir en los momentos difíciles.

Dra. Myriam muchas gracias por sus valiosos consejos, por su entusiasmo para invitarme a participar en proyectos internacionales, y por tener siempre el ánimo para resolver los imprevistos. Así también le agradezco el tener siempre las puertas abiertas para el uso de del Laboratorio de Biología Molecular y en el CIDICS la Unidad de Odontología Integral.

Dra. Catalina le agradezco todas las facilidades para trabajar en el Laboratorio de Química Analítica, gracias por todos sus consejos y recomendaciones que han sido de mucha utilidad en mi formación.

Dra. July, usted fue la experta inicial por la que me acerqué al estudio de los productos naturales, gracias por sus valiosos consejos, en especial con todo lo relacionado con la ratania, no hubiera sido posible su estudio sin sus indicaciones para localización en la colecta.

Dr. Alberto, muchas gracias por todas sus indicaciones para el estudio de toxicidad, sus recomendaciones han sido imprescindibles para el desarrollo de este trabajo.

Dr. Moises, agradezco su generosa disposición en la validación citotóxica sobre células mononucleares, este resultado fue muy valioso en este proyecto.

A mis autoridades en la Facultad de Odontología, Dra. Marianela Garza Enríquez y ahora Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera, mujeres de gran liderazgo y ejemplo tenaz, gracias por su interés y motivación constante para mi superación académica.

Así también, quiero agradecer profundamente a la Quím. Vilma por toda su valiosa experiencia que fue compartida de manera tan generosa, le agradezco todo su tiempo y su genuino interés por aportar en el proyecto.

Maestro Sergio, muchas gracias por su atenta disposición para instruir, gracias por su valiosa aportación en el conocimiento de la fitoquímica.

Quím. Margarita, muchas gracias por tu apoyo en el trabajo con los fibroblastos, por tu generosa ayuda en la metodología y la selección de literatura relacionada.

Gracias a todos mis maestros y compañeros de quienes a lo largo de este tiempo he aprendido y he crecido en el conocimiento de los Productos Naturales.

Finalmente quiero agradecer a mi modelo a seguir: Dra. María Elena García Ramírez, gracias por la ayuda y recomendaciones en esta que es tu área de experiencia profesional. Tu exigencia me hace ser mejor, gracias Ma.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología becario No.33819

Dra. Marianela Garza Enríquez

*Directora de Facultad de Odontología, UANL*

*Período 2006-2012*

Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera

*Directora de Facultad de Odontología, UANL*

*Período 2012-2015*

Gracias por todas las facilidades otorgadas para culminación de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	v
Tabla de contenido	x
Lista de figuras	xiii
Lista de tablas	xv
Nomenclatura	xvi
Resumen y Abstract	xviii
<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>4</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
4.1 Enfermedad periodontal	8
4.1.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	11
4.2 Citotoxicidad	12
4.3 Genotoxicidad	15
4.3.1 Prueba de Ames	17
4.4 Plantas de estudio:	19
4.4.1 <i>Krameria ramosissima</i>	19
4.4.2 <i>Larrea tridentata</i>	22
4.4.3 <i>Jatropha dioica</i>	25
4.4.4 <i>Leucophyllum frutescens</i>	28
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
5.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio	31

5.2 Obtención de extractos metanólicos	33
5.3 Pruebas química de los extractos obtenidos	35
5.4.Evaluación de actividad antibacteriana sobre <i>P. gingivalis</i>	38
5.4.1 Activación de la cepa bacteriana de estudio	38
5.4.2 Determinación de actividad antibacteriana	38
5.4.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria	40
5.4.4 Fraccionamiento mediante columna con el extracto de mayor actividad	42
5.4.4.1 Evaluación mediante antibiograma de actividad bactericida a <i>P. gingivalis</i> con las fracciones obtenidas	44
5.5 Evaluación de citotoxicidad de los extractos y fracciones de mayor actividad frente a <i>P.gingivalis</i>	45
5.5.1 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de azul tripán con células sanguíneas mononucleares	45
5.5.2 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de rojo neutro con fibroblastos	47
5.6.Evaluación de mutagenicidad mediante la prueba de Ames	49
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>51</b>
6.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio	51
6.2 Rendimiento de extractos metanólicos	52
6.3.Caracterización química de los extractos metanólicos obtenidos	53
6.4.Evaluación de actividad antibacteriana frente a <i>P. gingivalis</i>	54
6.4.1 Obtención de fracciones del extracto metanólico	55

de mayor actividad	
6.4.2 .Evaluación de actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de mayor actividad frente a <i>P. gingivalis</i>	57
6.5. Caracterización química preliminar de las fracciones del extracto de mayor actividad	59
6.6. Evaluación de citotoxicidad de los extractos y fracciones de mayor actividad frente a <i>P.gingivalis</i>	60
6.6.1 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de azul tripán con células sanguíneas mononucleares	60
6.6.2 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de rojo neutro con fibroblastos.	62
6.7.Evaluación de mutagenicidad mediante la prueba de Ames	63
<b>7. DISCUSIÓN</b>	64
<b>8. CONCLUSIONES</b>	70
<b>9. LITERATURA CITADA</b>	72
<b>10. APÉNDICES</b>	84
10.1 Resumen curricular	85
10.2 Artículo	86

## LISTA DE FIGURAS

No.	FIGURA	Página
1	Imagen de bacteria anaerobia <i>P. gingivalis</i>	12
2	<i>Krameria ramosissima</i>	19
3	<i>Larrea tridentata</i>	22
4	<i>Jatropha dioica</i>	25
5	<i>Leucophyllum frutescens</i>	28
6	Raíces de <i>K. ramosissima</i>	31
7	Colecta de <i>L. tridentata</i>	32
8	Colecta de <i>J. dioica</i>	32
9	Colecta de <i>L. frutescens</i>	33
10	Diagrama para la obtención de extractos	34
11	Diagrama para la determinación de actividad de los extractos metanólicos sobre <i>P. gingivalis</i>	39
12	Diagrama para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de extractos metanólicos sobre <i>P. gingivalis</i>	41
13	Diagrama para la obtención de fracciones mediante columna de sílica gel	43
14	Diagrama para la determinación de actividad de las fracciones del extracto de mayor actividad sobre <i>P. gingivalis</i>	44

<b>15</b>	Diagrama para la evaluación de citotoxicidad en células mononucleares mediante la técnica de azul tripán	46
<b>16</b>	Línea celular utilizada en el ensayo (CTR-7222, Hs 274 T)	48
<b>17</b>	Diagrama para la evaluación de citotoxicidad en fibroblastos mediante la técnica de rojo neutro	48
<b>18</b>	Diagrama para la evaluación de mutagenicidad mediante la Prueba de Ames (Kit Muta-ChromoPlate®, por EBPI	50
<b>19</b>	Extracto metanólico de <i>Larrea tridentata</i>	52
<b>20</b>	Efecto inhibitorio de loa extractos metanólicos para <i>Porphyromonas gingivalis</i>	55
<b>21</b>	Efecto inhibitorio de mayor actividad de las fracciones del extracto metanólico de <i>Krameria ramosissima</i>	58

## LISTA DE TABLAS

No.	TABLA	Página
I	Número de registro de especies de estudio	51
II	Porcentaje del rendimiento obtenido de los extractos metanólicos	52
III	Grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de las plantas en estudio	53
IV	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos sobre <i>P. gingivalis</i>	54
V	Fracciones agrupada del extracto de <i>K. ramosissima</i> de acuerdo al sistema de extracción utilizado	56
VI	Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>K. ramosissima</i> en <i>P. gingivalis</i>	57
VII	Grupos funcionales y metabolitos secundarios de las fracciones 6, 7, 9 y 13 de <i>Krameria ramosissima</i>	59

## LISTA DE GRÁFICAS

No.	GRÁFICA	Página
1	Viabilidad celular en linfocitos mediante la exposición del extracto y fracciones de <i>Krameria ramosissima</i>	61
2	Viabilidad celular en mastocitos mediante la exposición del extracto y fracciones de <i>Krameria ramosissima</i>	61
3	Viabilidad celular en fibroblastos mediante la exposición del extracto y fracciones de <i>Krameria ramosissima</i>	62
4	Mutagenicidad para el extracto metanólico y fracciones de <i>Krameria ramosissima</i>	64

## NOMENCLATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro (M10 <sup>-6</sup> litro)
Abs	Absorbancia
ATCC	American Type Culture Collection
cel	Células
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Días
DMSO	Dimetilsulfóxido , CH <sub>3</sub> SOCH <sub>3</sub>
g	Gramos
h	Horas
m	Metros
MeOH	Metanol
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
nn	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades formadoras de colonias

## RESUMEN

La enfermedad periodontal es un padecimiento bucal infeccioso, indoloro y lentamente progresivo que representa una alta incidencia a nivel mundial. Dentro de la flora patógena asociada se encuentra la bacteria anaerobia *Porphyromonas gingivalis*, la cual ha sido asociada también como inductor de lesiones coronarias, neumonía y preeclampsia. En este estudio se analizaron cuatro especies de plantas del norte de México: *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y *Leucophyllum frutescens*, de los cuales se obtuvieron sus extractos mediante la técnica de extracción continua utilizando metanol como solvente; se obtuvieron sus rendimientos y se realizaron pruebas químicas para identificación preliminar de compuestos. Posteriormente mediante la técnica de difusión en disco con la bacteria de interés se encontró que el extracto de *K. ramosissima* fue el de mayor actividad inhibitoria, por lo que se procedió a fraccionar este extracto mediante cromatografía en columna obteniendo 14 fracciones las cuales fueron evaluadas para su actividad antibacteriana obteniendo la concentración mínima inhibitoria del extracto (300 µg/ml) mediante el método de microdilución. Cuatro fracciones resultaron con mayor actividad contra *P. gingivalis*, las cuales fueron evaluados sobre células mononucleares mediante la técnica de azul tripán y sobre fibroblastos humanos con la técnica rojo neutro; así también se les realizó la prueba de Ames en microdilución obteniendo que resultados negativos en las pruebas de citotoxicidad y mutagenicidad. Por lo tanto se concluye el extracto metanólico de la raíz de *K. ramosissima* así como las fracciones identificadas con mayor inhibición frente a *P. gingivalis*, son una alternativa segura para su inclusión en estudios clínicos para la prevención y manejo terapéutico de la enfermedad periodontal.

## ABSTACT

Periodontal disease is an infectious oral disease, slowly progressive painless and represents a high incidence worldwide. Within pathogenic flora is associated anaerobic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, which also has been linked to induce coronary lesions, pneumonia and preeclampsia. In this study, we examined four species of plants of northern Mexico: *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* and *Leucophyllum frutescens*, from which extracts were obtained by continuous extraction technique using methanol as solvent, were obtained yields and conducted chemical tests for preliminary identification of compounds. Later by disk diffusion method with the bacterium of interest was found that the extract of *K. ramosissima* had the highest inhibitory activity, so they proceeded to fractionate the extract by column chromatography to obtain 14 fractions which were evaluated for their antibacterial activity by obtaining the minimum inhibitory concentration of the extract (300 µg / ml) by the method of microdilution . Four fractions were most active against *P. gingivalis*, which were assessed on mononuclear cells by trypan blue technique and human fibroblast neutral red technique, so also was performed in the Ames test to microdilution obtaining negative test results of cytotoxicity and mutagenicity. Thus concludes the methanol extract of the root of *K. ramosissima* fractions identified as the most inhibition against *P. gingivalis*, are a safe alternative for inclusion in clinical trials for prevention and therapeutic management of periodontal disease.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gingivales y periodontales presentan una alta incidencia a nivel mundial, se estima que la gingivitis afecta cerca del 80% de los niños en edad escolar y más del 70% de la población adulta ha padecido gingivitis, periodontitis o ambas (Garza E. 2009), además de que es considerada como la segunda causa asociada a la pérdida dental (Almaguer *et al*, 2005). Este padecimiento se caracteriza por ser una enfermedad infecciosa, indolora y lentamente progresiva, siendo uno de los agentes etiológicos principales la bacteria anaerobia *Porphyromonas gingivalis* (Liébana *et al* 2004). Además de su importante impacto en el estado de la salud bucal, ésta bacteria en particular ha sido asociada con otros padecimientos tales como enfermedades cardiovasculares, neumonía, eventos que favorecen a la preclamsia, entre otros. (Brodala *et al* 2005), es por ello que el componente bacteriano de la enfermedad periodontal tiene que ser valorado también por su implicación sistémica.

La elevada prevalencia de la enfermedad periodontal fundamenta la constante búsqueda de agentes antimicrobianos viables que puedan incidir para abatir esta infección. El tratamiento consiste principalmente en la remoción mecánica del cálculo supra y subgingival en el cual se alojan las bacterias cuyos productos metabólicos originan la destrucción de los tejidos de soporte del diente,

en conjunto con el tratamiento quirúrgico se considera el uso de fármacos sistémicos tales como la amoxicilina, metronidazol y azitromicina que cuentan con el espectro adecuado para cubrir la microbiota patógena asociada; sin embargo al uso de éstos fármacos también se atribuyen efectos secundarios indeseables, y la posibilidad de generar resistencia bacteriana. Se ha comprobado que el uso de colutorios con agentes antisépticos ha influido en los estados iniciales a la enfermedad periodontal, algunos de ellos de origen químico como la clorhexidina, y otros con aceites esenciales como el timol, mentol y eucaliptol (Enrile y Santos, 2005).

De los antisépticos estudiados, la clorhexidina ha demostrado mayor eficacia clínica, sin embargo algunas desventajas es que produce manchas y pigmentaciones oscuras en los dientes, lengua y restauraciones, cambia el regusto de los alimentos, produce irritación en la mucosa bucal y su costo que supera en promedio el doble del valor por el que se adquieren los enjuagues que contienen aceites esenciales (Southern *et al*, 2006). Recientes estudios han demostrado que el digluconato de clorhexidina al 0.12%, que es el agente activo de algunos de los antisépticos mas recomendados durante el tratamiento periodontal son citotóxicos (Torres-Capetillo *et al* 2013, Gianelli *et al* 2008)

En la actualidad, existe un interés especial por retomar el estudio de las propiedades de los extractos naturales, entre los años 1981 y 2006, más del 50% de los medicamentos aprobados se basaron sobre estructuras de productos naturales (López 2011).Una de las ventajas principales de los productos naturales

es la fácil asimilación por el hombre. La Organización Mundial de la Salud ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, con bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para la administración en humanos (Sánchez *et al* 2000).

En el área odontológica, existen estudios donde se ha comprobado actividad antimicrobiana para bacterias periodontopatógenas con extractos de hojaseñ (*Florenxia cernua*), granada (*Punica granatum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) por mencionar algunos (Picasso 2006, Menezes *et al* 2006, Jadhav *et al* 2004, Montemayor 2004) sin embargo en la mayoría de ellos no se presenta evaluación de su actividad citotóxica y mutagénica, es por ello que se propone en el presente estudio analizar cuatro plantas de la región del norte de México, con el objetivo de evaluar actividad antibacteriana frente la bacteria de interés: *Porphyromonas gingivalis*, conocer su comportamiento *in vitro* a nivel celular y evaluar si tiene posible comportamiento mutagénico. De esta forma, se tendría un conocimiento sobre el alcance terapéutico de los extractos que resultaran activos, así como la valoración para el uso seguro en individuos.

## 2. HIPÓTESIS

Las especies de *Krameria ramosissima*, *Jatropha dioica*, *Larrea tridentata* y *Leucophyllum frutescens* presentan actividad sobre bacterias periodontopatógenas, no son citotóxicas ni presentan actividad mutagénica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad bactericida, citotóxica y mutagénica de *Krameria ramosissima* (ratania), *Jatropha dioica* (sangre de drago), *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Leucophyllum frutescens* (cenizo).

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad bactericida sobre *Porphyromonas gingivalis* de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.
2. Separar mediante métodos cromatográficos los extractos que presenten actividad inhibitoria sobre *P. gingivalis*.
3. Evaluar las fracciones obtenidas sobre *P. gingivalis*.
4. Evaluar actividad citotóxica del extracto y fracciones que resulten con mayor actividad inhibitoria sobre la bacteria en estudio.
5. Valorar la actividad mutagénica del extracto y fracciones activas mediante la prueba de Ames.

#### 4. ANTECEDENTES

Actualmente se reconoce que las civilizaciones antiguas han rendido tributo a muchas plantas por sus propiedades curativas. Este conocimiento se ha transmitido a lo largo de los siglos sin que se conociera precisamente el por qué o cómo actuaban; en su mayoría el efecto producido era frecuentemente asociado a un sustento espiritual o mítico. Aun así es indiscutible reconocer que el uso milenario de estos compuestos ha sido el punto de partida de muchos de los actuales medicamentos que hoy se conocen y de los cuales se tiene evidencia científica respecto a sus propiedades terapéuticas. (Nigenda *et al*, 2001)

El término etnomedicina o medicina tradicional se utiliza a veces como sinónimo de la etnobotánica y etnofarmacología para expresar la misma idea, aunque hay diferencias entre ellos. La etnofarmacología consiste en un área de investigación multidisciplinaria que comprende la observación, descripción e investigación experimental de sustancias naturales de uso tradicional y la evaluación de sus actividades biológicas; incluye el estudio de sustancias de origen animal, microbiano o vegetal, mientras que la etnobotánica se centra específicamente en las plantas (Turner, 1995; Bonet y Valles, 2002; Mc Clatchey *et al*, 2009).

Estudios relacionados con la etnobotánica estiman que el 75 % de la población mundial utiliza las plantas medicinales; y que el uso tradicional fundamental es a partir de decocciones de las plantas enteras o de sus partes y no el uso de sus principales componentes aislados y purificados; esto se debe a la falta de estudio y descripción de los componentes activos de los extractos naturales. Se estima en 5,000 el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica, esto representa una pequeña fracción del total estimado en 300,000 especies. De esta forma es importante considerar el estudio no solamente de las actividades terapéuticas, sino también de sus efectos tóxicos y su posología, ya que se reconoce que algunos de ellos pueden actuar como potentes venenos si se utilizan a determinadas dosis (Sánchez *et al*, 2000).

La aceptación y uso de plantas con actividad terapéutica en instituciones de la medicina familiar en el norte de México ha sido documentada, en el estudio de Taddei *et al*, 1999 realizado en la Unidad de Medicina Familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social encontrando datos entre los usuarios donde aceptan el uso de herbolaria en un 92% y los médicos en un 83%. Algunos otros referentes como Romero *et al* (2004) coinciden en el uso frecuente de este recurso en la población mexicana, y la necesidad de que la información científica sea accesible entre la población y el profesional de la salud para reconocer los usos adecuados y sus efectos adversos.

En el área odontológica existen algunos estudios como los reportados por Waizel y Martínez 2007 y 2011 donde se documentan diferentes especies de

plantas que se han utilizado en el manejo de odontalgias y en el manejo de la enfermedad periodontal, respectivamente. Algunas de estas especies son nativas y en otros casos introducidas. En este estudio las especies seleccionadas: *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y *Leucophyllum frutescens* se consideran plantas nativas, son de acceso disponible para su recolección en la zona norte de México, y si bien existen algunos estudios donde se ha investigado su uso terapéutico, existe poca evidencia sobre su uso odontológico y en específico su actividad sobre bacterias periodontopatógenas (Picasso, 2006).

#### **4.1 Enfermedad periodontal**

Se define como enfermedad periodontal a un grupo de alteraciones que se producen en el aparato de soporte de los dientes. Esta enfermedad se asocia a una respuesta de defensa orgánica en presencia de algunas bacterias y sus productos, y se manifiesta como un proceso de tipo inflamatorio que inicia en la encía que circunda los dientes. Si el irritante persiste en tiempo y cantidad, el proceso inflamatorio se mantiene difundiéndose hacia tejidos más profundos, como el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar, produciendo cambios proliferativos degenerativos y necróticos. (Velázquez *et al*, 2006)

Se sabe que la enfermedad periodontal se presenta de forma intermitente, esto es, en periodos de actividad y remisión, dañando de esta forma de manera irreversible a los tejidos y causando su destrucción. Si bien su comienzo se asocia

a la presencia de la placa dentobacteriana, la respuesta del individuo y el avance de la enfermedad pueden estar relacionados a factores del estado general, tales como deficiencias nutricionales, alteraciones de tipo hormonal, metabólico, infecciones asociadas, enfermedades degenerativas o autoinmunes entre otras (Maupomé *et al* 2007).

La lesión inflamatoria inicial denominada gingivitis, afecta sólo a los tejidos blandos; se designa periodontitis a la alteración que afecta estructuras como el ligamento periodontal y el hueso alveolar, que resulta en pérdida de la inserción y de soporte de los dientes (Garza 2009).

Se reconoce que la enfermedad periodontal tiene un factor microbiológico importante, en la actualidad se ha descrito a la flora que coloniza el área subgingival donde se crea un nicho ecológico con características únicas en la cavidad bucal, esta descripción ha determinado que la flora participante en estos procesos patológicos esté constituida principalmente por formas bacilares o cocobacilares Gram (-), proteolíticas y anaerobios obligados y facultativos. (Liébana *et al* 2004). En el área subgingival destaca la presencia de una gran superficie factible de ser colonizada por estos patógenos, formándose en los sitios enfermos un saco periodontal donde difícilmente llegan los mecanismos de autolimpieza de la boca y donde se encuentran áreas con una baja tensión de oxígeno y otras, exentas de este elemento. Por otro lado, aumenta el fluido gingival crevicular, que es un extravasado de plasma a nivel de la encía, con lo cual se le aportan nutrientes a los microorganismos colonizadores de este territorio. (Silva, 2003)

Se consideran tres especies fuertemente relacionadas con la progresión y el tratamiento no exitoso de la enfermedad periodontal, ellas son: *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus* (Newman 1990).

Se han documentado tratamientos específicos para la eliminación de *P. gingivalis* en casos de individuos con periodontitis refractaria al tratamiento; éste incluyó la administración sistémica de amoxicilina/clavulanato potásico, aplicación intrasulcular de povidona yodada y enjuagues de clorhexidina dos veces al día. Los resultados obtenidos fueron que cuando se redujo la concentración de *P. gingivalis* por debajo del umbral de detección en 10 de los 11 individuos que inicialmente presentaban dicho microorganismo, se registraron importantes aumentos en el nivel de inserción gingival medio. En tres de los individuos donde se detectaron *P. gingivalis* u otras especies de *Bacteroides* después del tratamiento no se obtuvieron signos de mejoría clínica. (Collins *et al*, citado por Teles *et al* 2000).

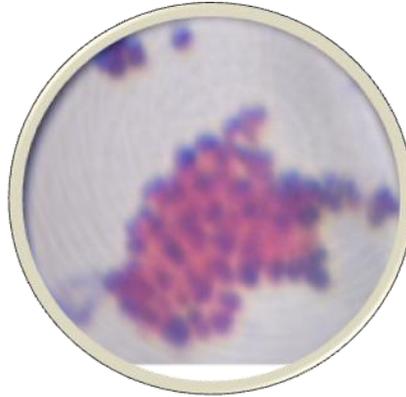
Es importante citar que en estudios recientes se ha confirmado la participación de *P.gingivalis* como inductor de lesiones coronarias (Brodala *et al* 2011), neumonía (Okuda *et al* 2005), preclampsia (Contreras *et al* 2006); esto revaloriza el papel infeccioso ya no solo con implicaciones localizadas en boca sino abarcando un riesgo sistémico.

#### **4.1.1 *Porphyromonas gingivalis***

Es un cocobacilo, Gram (-), pigmentado de negro, asacarolítico y anaerobio estricto, perteneciente al género *Porphyromonas* de la familia *Bacteroidaceae* (Naito *et al* 2008 y Navarrete *et al* 2010,).

Numerosas líneas de investigación confirman clínicamente el rol etiológico de *P. gingivalis* en la periodontitis, principalmente en la forma crónica de la enfermedad (Nori *et al*, 2004), y su determinación en el saco periodontal se ha asociado directamente a la destrucción tisular progresiva

Adicionalmente, *P. gingivalis* se ha identificado como un factor asociado en ciertas condiciones sistémicas, tal como aterosclerosis, trastornos cardiacos, neumonía, preeclamsia y parto prematuro (Brodala *et al* 2011, Okuda *et al* 2005, Contreras *et al* 2006).



**Figura 1: Imagen de *P. gingivalis* (ATCC 53978) Tomada por Villarreal, 2010**

## **4.2 Citotoxicidad**

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

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

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

A continuación se citan diferentes estudios donde se valoran efectos citotóxicos de las plantas de estudio:

En relación con la especie *K. ramosissima*, Torres-González en el 2011 reporta toxicidad en el extracto de la parte aérea de la planta con la línea celular de hepatoma humano (Huh7). El trabajo publicado por Arroyo *et al* en el 2005, maneja la citotoxicidad de un integrante del género *Krameria*, evaluaron el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) y el extracto acuoso de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) en cultivos de líneas celulares cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central, encontrando que las fracciones procedentes de la asociación de los dos productos naturales mostraron una acción citotóxica frente a las células evaluadas.

Sheikh *et al* (1997) reportaron toxicidad con la ingesta en humanos con *Larrea tridentata* (gobernadora), en este estudio se registran 18 casos clínicos con efectos adversos relacionados con la ingestión de ésta planta utilizada como suplemento dietético por sus propiedades antioxidantes. Trece de los casos fueron confirmados con hepatitis colestásica inducida por fármacos, en dos de ellos se

registró insuficiencia hepática fulminante. Otros reportes similares de hepatotoxicidad asociada a gobernadora o chaparral conocida así por su nombre común son los realizados por Aldemar *et al* 1994, Batchelor *et al* 1995 y Chiturri y Farrell 2000.

Rakshit *et al* 2010 y 2011, realizaron estudios sobre la familia *Jatropha*, donde se documenta la toxicidad en humanos por *Jatropha multifida* y *J. curcas* por consumo de semillas produciendo vómito, diarrea, miosis y deshidratación. Los efectos citotóxicos en líneas celulares MT-4 con extracto acuoso de *J. curcas* alcanzaron una IC<sub>50</sub> de 24 mg/ml. También se registra la citotoxicidad sobre células tumorales de sistema nervioso U251 y la línea de leucemia K562, esto con extracto metanólico de la corteza de *J. neopauciflora* los valores obtenidos fueron 34.29 g/ml y 43.12 g/ml respectivamente.

La citotoxicidad con *Leucophyllum frutescens* reportada por Molina 2004, donde se aislaron compuestos de la raíz de esta planta los cuales fueron evaluados frente a *Mycobacterium tuberculosis*, los compuestos que presentaron mayor inhibición fueron expuestos con larvas de *Artemia salina* alcanzando para el compuesto 3 una CL<sub>50</sub> de 9.87 µg/ml y el compuesto 4 obtuvo CL<sub>50</sub> de 8.72 µg/ml.

### **4.3 Genotoxicidad**

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, las consecuencias para el hombre de la exposición a mutágenos. Un mutágeno es considerado cualquier agente que induzca mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas estructurales, numéricas; alteraciones al DNA, a los mecanismos de reparación o a los eventos de recombinación mitótica, etc (Hoffman 1996).

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

Nivel I: Mutación génica

Nivel II: Mutación cromosómica

Nivel III: Daño primario del DNA

Nivel IV: Transformaciones celulares

Los ensayos de mutación genética y mutación cromosómica son los más utilizados. En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del DNA (nivel III) han alcanzado importancia entre los análisis de genotoxicidad, ya que permiten comprender los procesos carcinogénicos o de transformación tumoral de las células.

Algunas de las pruebas reconocidas en los niveles antes citados son las siguientes:

Nivel I: Mutaciones génicas:

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

Nivel II: Mutaciones cromosómicas:

- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos.
- Prueba citogenética *in vivo* en ratones.
- Prueba de micronúcleos (ratones y CHO).
- Prueba de dominantes letales en ratones.

Nivel III: Evaluación daño primario al DNA:

- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.

- Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Prueba de mutación y recombinación mitótica en *Drosophila melanogaster* (SMART).
- Prueba de intercambio de cromátidas hermanas in vitro con células de mamíferos.

Nivel IV:

- Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.

#### **4.3.1 Prueba de Ames**

Desarrollado en 1973 por Bruce Ames, fue el primer ensayo de corta duración desarrollado para detectar mutagenicidad en agentes químicos. Gracias a este ensayo en 1975 demostró que el 60-90% de las sustancias químicas carcinogénicas eran a su vez mutagénicos (Ames B *et al* 1975).

La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura o por sustitución de pares de bases

del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se realiza el ensayo de fracción microsomal de hígado de rata, que consiste en un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema (Sandoval 1998).

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

La prueba de Ames se utiliza en la evaluación de mutagenicidad de muestras problema (agua, aire, residuos sólidos, extractos acuosos, etc.). Actualmente existen preparados comerciales que contienen la cepa estandarizada y los componentes químicos para realizar la prueba en microdilución. Esta prueba es considerada parte esencial de las pruebas toxicológicas para la detección y localización de fuentes que generen un daño potencial por la presencia de compuestos genotóxicos.

#### 4.4 Plantas de estudio:

##### 4.4.1 *Krameria ramosissima*

Reino: Plantae

División: Embryophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Polygalales

Familia: Krameraceae

Género: *Krameria*

Especie: *K. ramosissima*

(Gray)Watson



**Figura 2:** *Krameria ramosissima*

Nombre común: Ratania, Calderona

Es un arbusto generalmente menor de 60 cm, difusamente ramificado y rígido, algunas veces casi postrado. Las flores aparecen de abril a mayo, solitarias, en pedúnculos axilares, de marrón a púrpura, alrededor de 1.2 cm de ancho o menos; con cinco sépalos, cinco pétalos desiguales, los tres superiores largos y de forma de garras, los inferiores más cortos, sésiles y carnosos; estambres: cuatro libres; anteras: dos.

Fruto pedunculado de 1.2 cm de longitud con pelillos densos, globoso u ovoide, densamente pubescente, rojo, con espinas no barbadas, una semilla. Hojas alternas o fasciculadas en las axilas, simples, lineales o lanceoladas, agudas o acuminadas, de 0.2 a 0.6 cm de longitud, margen entero, densamente tomentoso, gris (Verde Star, 1987).

Distribución geográfica:

En los Estados Unidos de América, al sur y oeste de Texas, a lo largo del Río Grande. En México, en Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León.

Usos asociados:

No se encontraron estudios específicos que describan una actividad antibacteriana específica con la especie *K. ramosissima*, Achenbach *et al* (1986) describe el uso de las raíces mediante un té para tratar diarrea y fiebre leve.

Simpson (1991) documenta que el nombre de ratania fue utilizado como nombre común para algunas especies del género *Krameria*, siendo ampliamente utilizada en la medicina europea y euro-americana entre los años 1820 y 1920; sus usos se centraron en las propiedades astringentes de los extractos taniníferos de las raíces.

Algunos otros usos relacionados con especies del género *Krameria* son los realizados por Di Pierro *et al* 2009, donde utilizan el extracto de *Krameria triandra* en el uso de vulvovaginitis infecciosa.

En el área odontológica Jagan Rao *et al* 2012, realizan un listado de plantas que han sido utilizadas para la gingivitis, relacionando la especie *K. triandra*, la presencia de taninos entre sus componentes y asociando un efecto astringente.

#### 4.4.2 *Larrea tridentata*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Zygophyllales

Familia: Zygophyllaceae

Género: *Larrea*

Especie: *L. tridentata* (DC) Coville



**Figura 3:** *Larrea tridentata*

Nombre común: Gobernadora, Creosote, Chaparral

Arbusto muy ramificado, perennifolio, de 0.6 a 3 m de altura. Sus hojas formadas por 2 folíolos unidos entre sí en la base. Los folíolos oblicuamente ovados a lanceolados o falcados, divaricados, de 4 a 15 mm de largo por 3 a 8 mm de ancho, enteros, coriáceos, resinosos, de olor penetrante, verde o verde amarillentos. La copa tiene un volumen promedio de 0.124 m<sup>3</sup> x arbusto.

Es ramificado desde la base. Sus flores son solitarias de 2.5 cm de diámetro, sépalos elípticos de 6 mm de largo por 4 mm de ancho, pubescentes, caedizos; pétalos de color amarillo fuerte, oblongos a lanceolados, de 1 cm de largo por 3 a 5 mm de ancho, caedizos. Su fruto es subgloboso a obovoide, de 7 mm de largo, coriáceo, con pelos blancos, sedosos, que se vuelven café-rojizos con el tiempo, 5 mericarpios con una semilla cada uno. La semilla café a negra, algo curvadas, de 2 a 4 mm de largo; con contornos triangulares, embrión con los cotiledones paralelos al plano longitudinal.

Su sistema radicular superficial, poco profundo y muy extenso. Llega a ocupar casi el total del espacio que hay entre un arbusto y otro.

Distribución geográfica:

Se distribuye abundantemente en el norte de país, de la Península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo. (Rzedowski y Calderón 1994).

Usos asociados:

Lira-Saldívar en el 2003, realizó una revisión de la actividad biocida de la gobernadora, encontrando investigaciones que comprueban la actividad fungicida *in vitro* e *in vivo*. Así también detalla bioensayos con microorganismos que atacan a humanos donde se encontró sensibilidad a más de 45 bacterias, 10 levaduras, nueve hongos y tres parásitos intestinales. Se ha documentado que los flavonoides presentes en la composición de la gobernadora son activos contra virus del RNA.

En el uso odontológico, se registra un estudio realizado por Picasso (2006) donde se analizó la actividad de varios extractos metanólicos entre ellos de *L. tridentata*, encontrando actividad contra dos bacterias periodontopatógenas, pero no así contra *Porphyromonas gingivalis*.

#### 4.4.3 *Jatropha dioica*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Jatropha*

Especie: *J. dioica* (Sessé ex Carv)



**Figura 4:** *Jatropha dioica*

Nombre común: Sangre de drago, Sangre de grado, Sangregado.

Arbusto o subarbusto de 0.3 a 1.5 m de alto, dioico; tallo carnoso, flexible, con látex incoloro de aspectos acuoso, ramas rojizas; hojas generalmente fasciculares, pecioladas, lineares a espatuladas de 5 a 7 cm de largo por 1-3 cm de ancho, borde entero; flores fasciculadas, colocadas al lado de las hojas, las flores con cáliz unido a la base, corola con tubo definido las masculinas con cáliz de 3 a 3.5 mm de largo, corola blanquecina de más o menos el mismo largo, ovario con 1 o 2 lóculos y estilos; fruto de cerca de 1.5 cm de largo y de ancho, con frecuencia asimétrico, apiculado, ligeramente alado y con una sola semilla, esta es subesférica, algo aplanada en la superficie ventral, de alrededor de 2 cm de diámetro, de color café a veces con muchas contrastantes, casi lisa carúncula diminuta (Steinmann 2002).

Distribución geográfica:

Desde Texas (EUA) y Chihuahua hasta Oaxaca, en la mayoría de los estados del centro del país.

Usos asociados:

Manzanero *et al* en el 2009, realizaron un estudio sobre la etnobotánica de siete raíces medicinales en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México, dentro de las cuales está *J. dioica*, en la cual se describen dentro de sus usos comunes la

utilización contra la caída del cabello, para el dolor de riñones y problemas con la digestión.

La actividad contra bacterias periodontopatógenas no ha sido reportada *in vitro*, sin embargo en diversos estudios se menciona el uso tradicional las raíces para combatir la gingivitis y periodontitis (Wong-Paz *et al* 2010, Waizel-Bucay y Martínez, 2011).

#### 4.4.4 *Leucophyllum frutescens*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Scrophulariales

Familia: Scrophulariaceae

Género: *Leucophyllum*

Especie: *L. frutescens* (Berl) Johnston



**Figura 5:** *Leucophyllum frutescens*

Nombre común: Cenizo, Cenicilla, Hierba del cenizo

Arbusto de copa irregular con denso follaje, hasta de 2.5 m de alto, tallos jóvenes con una densa pubescencia estrellada, corteza lisa de color grisáceo. Sus hojas son simples, persistentes, opuestas o verticiladas, elípticoovaladas, enteras, color gris verdosas en ambas superficies pubescentes. Su flor puede ser color rosa-lavanda, vistosas, solitarias, en forma de embudo o más comúnmente campanuladas. El fruto es pequeño, capsular con numerosas semillas. El período de floración es entre los meses de Marzo-Junio; aunque puede florear todo el año, después de las lluvias.

Distribución geográfica:

En los matorrales submontanos o espinosos, sobre suelos delgados y pedregosos localizados en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. (Alanís y González 2003).

Usos asociados:

Balderas-Renteria *et al* en el 2007, encontraron actividad hepatoprotectora del extracto metanólico de *Leucophyllum frutescens* en ratas albinas Wistar intoxicadas con tetracloruro de carbono. En el 2012 Alanís-Garza *et al* publicaron el fraccionamiento guiado de la corteza de la raíz de *L. frutescens* con actividad

contra *Mycobacterium tuberculosis*. El uso odontológico del cenizo no ha sido documentado.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio

Las raíces de *Krameria ramosissima* se obtuvieron en el municipio de Cadereyta, Nuevo León, México en febrero de 2010. Una muestra de esta planta se ha resguardado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, México



**Figura 6:** Raíces de *K. ramosissima*

Se colectaron hojas y tallos de *Larrea tridentata*, las cuales fueron obtenidas en el municipio de Hidalgo, Nuevo León en el km 23 de la carretera a

Mina N.L en enero del 2010. Una muestra fue catalogada y depositada en el Herbario de la FCB de la UANL.



**Figura 7: Colecta de *L. tridentata***

La colecta de raíces de *J. dioica* fue realizada en el mes de enero 2010, se realizó en la localidad del Ejido La Colorada, en Santa Catarina Nuevo León



**Figura 8: Colecta de *J. dioica***

Se recolectaron hojas y tallos de *L. frutescens* en la localidad de Puerta Mitras en el municipio de Santa Catarina, N.L.



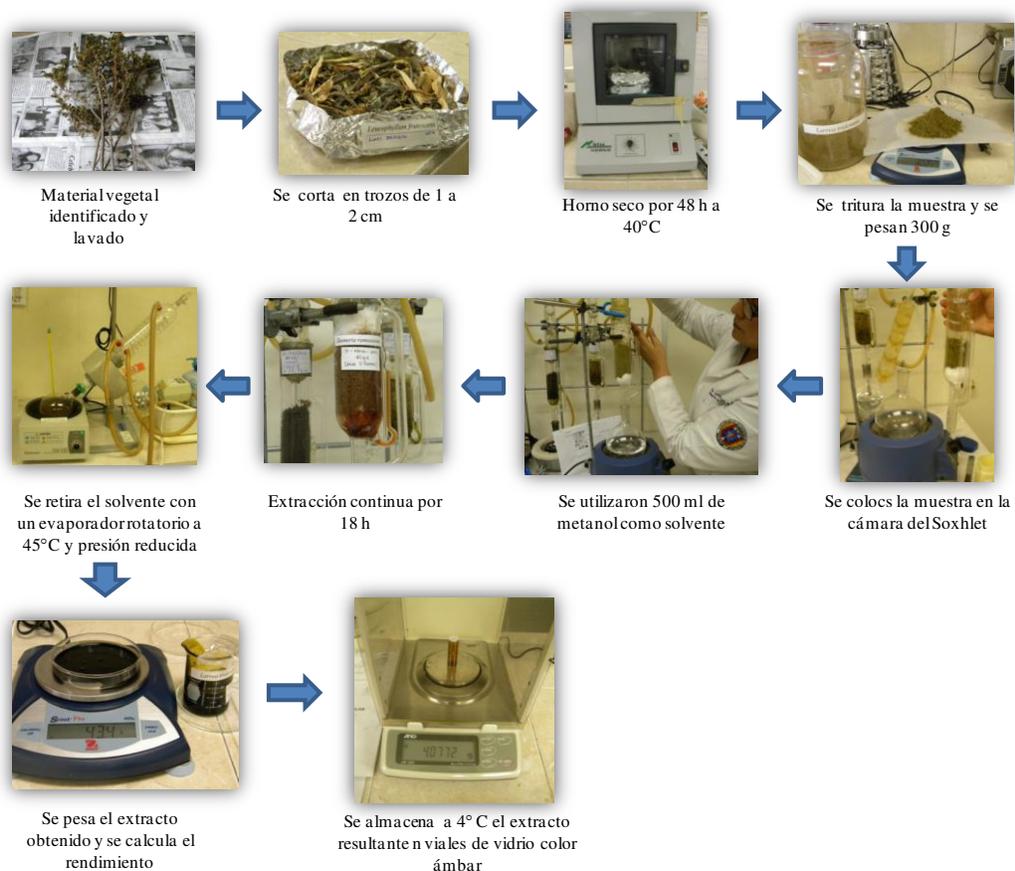
**Figura 9:** Colecta de *L. frutescens*

## **5.2 Obtención de extractos metanólicos**

El material vegetal fue lavado, los tallos y raíces cortados en tramos pequeños de 1 a 2 cm de largo, y posteriormente sometidos a un horno seco a 40°C durante 48 h para retirar la mayor humedad posible (Horno marca Felisa® modelo FE-295V). Una vez secos, las muestras fueron trituradas por separado en un molino manual marca Victoria® y almacenados en un recipiente seco.

Para la elaboración del extracto, fueron pesados 300 g de cada muestra vegetal en una balanza de precisión marca Ohaus® (modelo Scout-Pro), se colocó esta cantidad en la cámara del Soxhlet, y fue sometida a extracción continua por 18 h utilizando como solvente 500 ml de metanol (CTR Scientific). El extracto se

concentró en un evaporador rotatorio a baja temperatura (40-45 ° C) y presión reducida (Marca Yamato, modelo BM 100). El extracto resultante fue pesado y envasado en viales de vidrio color ámbar y refrigerados a 4°C hasta su uso.



**Figura 10: Diagrama para la obtención de extractos**

### **5.3 Pruebas químicas de los extractos obtenidos**

Con el propósito de obtener un análisis químico preliminar para identificar la presencia de grupos funcionales de los compuestos involucrados en los extractos obtenidos se realizaron las siguientes pruebas que se encuentran descritas por Domínguez (1979).

#### **Prueba de Liebermann Burchard:**

Se realiza para determinar la presencia de triterpenos y compuestos esteroidales (esteroles y metilesteroles). Se disuelven dos gotas de la muestra en cloroformo y luego se añaden dos gotas del reactivo, la prueba es positiva al observar cambios de coloración. El reactivo se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 ml de anhídrido acético y 1.0 ml de cloroformo.

#### **Prueba de Salkowski:**

Se añaden dos gotas de la muestra, dos gotas de cloroformo y dos gotas de ácido sulfúrico, cuando es positiva la prueba se desarrollan colores amarillo o rojo, para esteroles y metilesteroles.

#### **Prueba de Shinoda:**

Para compuestos de tipo flavonoide (chalconas, flavononas, flavonoles, flavononoles, ó xantonas) 1.0 mg de la muestra disuelta en etanol y unas limaduras

de magnesio y después unas gotas de HCL por la paredes. Se considera positiva con la aparición de colores naranjas, rojo, azul o violeta.

#### Prueba de Baljet:

Para sesquiterpenlactonas, se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A, un gramo de ácido pícrico en 100 ml de etanol; la solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 ml de A, 4 ml de B y 100 ml de agua, la prueba es positiva si se presenta una coloración naranja o roja oscura.

#### Prueba de Ácido sulfúrico:

Para compuestos tipo flavonoide; se colocan dos gotas de la muestra, dos gotas de ácido sulfúrico concentrado; se observa coloración amarilla para flavona y flavonoles, naranja- guinda para flavonas, rojo azulado para chalconas y también detecta quinonas con coloración rojo púrpura.

#### Prueba del Permanganato de Potasio:

Para insaturaciones; se disuelven 2 gotas de la muestra en dos gotas de agua, acetona o metanol y se le agregan dos gotas de la solución de permanganato de potasio el cual se prepara con una solución de permanganato de potasio al 2% en agua; se considera positiva la prueba si se presenta un precipitado color marrón.

#### Prueba de Cloruro Férrico:

Para oxhidrilos fenólicos, se disuelven dos gotas de la muestra en etanol y se le añaden dos gotas de la solución de cloruro férrico en agua al 12.5% en un placa de porcelana; la aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se considera positiva.

#### Prueba de Molisch:

Para carbohidratos; en un tubo de ensaye se agregan 3 gotas de la muestra y 3 gotas del reactivo, el cual se prepara disolviendo 1 g de alfa naftol en 100 ml de etanol al 95% y se agita. Después se inclina el tubo y se depositan 2 ml de ácido sulfúrico concentrado por la pared; la prueba se considera positiva si se forma un anillo coloreado en la interfase.

#### Prueba del Hidróxido de sodio al 10%:

Es para cumarinas; en dos gotas de la muestra se hacen reaccionar con dos gotas de una solución de NaOH al 10% dando un color amarillo o anaranjado que desaparece al agregar dos gotas de HCL.

#### Prueba de Dragendorff:

Se usa la modificación de Munier y Machelobuf, para la determinación de alcaloides. Para ello se preparan dos soluciones, la solución A con 0.85 g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclan con 10 ml ácido acético glacial y 40 ml de agua y solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 200 ml de agua. El

reactivo se prepara mezclando 5 ml de A, 4 ml de B y 100 ml de agua; la prueba da positiva si se presentan coloraciones rojo o naranja persistentes por 24 h.

#### **5.4. Evaluación de actividad antibacteriana frente a *P. gingivalis***

##### **5.4.1 Activación de la cepa bacteriana de estudio**

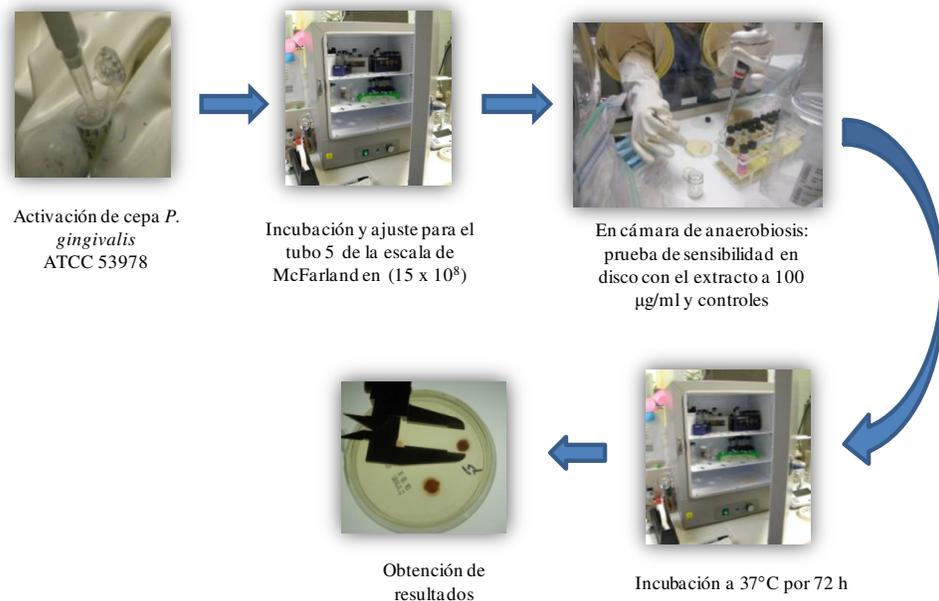
Se obtuvo la cepa de referencia ATCC 53978 correspondiente a *Porphyromonas gingivalis* W50, la cual fue activada mediante medio Mueller Hinton Marca Difco®, en una cámara de anaerobiosis Plas Labs® (modelo 830-ABC), con una mezcla anaerobia compuesta por 10/13 cmol/mol bióxido de carbono, 20/13 cmol/mol hidrógeno y balance con nitrógeno (Praxair®).

Los medios inoculados fueron incubados a 37 ° C durante 72 h para permitir el máximo crecimiento de los organismos según la curva de crecimiento establecida por Navarrete *et al* 2010.

##### **5.4.2 Determinación de actividad antibacteriana**

Se utilizó el método de difusión en disco (Bauer et al., 1966, Hall, 2007) para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos obtenidos frente a *Porphyromonas gingivalis*. Se utilizó la cepa de referencia ATCC 53978, la cual fue ajustada al tubo 5 de la escala de McFarland en ( $15 \times 10^8$ ), se tomaron 100 µl de cada tubo con el crecimiento bacteriano y se depositó en cajas Petri con medio Mueller Hinton (Difco®), posteriormente se toman 10µl del extracto y las

fracciones a probar, para impregnarse en papel filtro estéril de Whatman #1. Se realizan 4 repeticiones de cada extracto. La concentración a evaluar de los extractos fue de 100 µg/ml, utilizando como solvente DMSO (CTR Scientific) al 5% con agua bidestilada estéril; como sustancias control se utilizaron agua con DMSO al 5% como control negativo y Clorhexidina (Consepsis, Ultradent®) al 0.12% (Southern et al, 2006) como control positivo. El procedimiento fue realizado dentro de una cámara de anaerobiosis marca Plas Labs® modelo 830-ABC, con una mezcla anaerobia compuesta por 10/13 cmol/mol bióxido de carbono, 20/13 cmol/mol hidrógeno y balance con nitrógeno, por Praxair®. Las placas se incubaron finalmente a 37 ° C durante 72 h. La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición expresado en mm. El experimento se llevó a cabo por triplicado

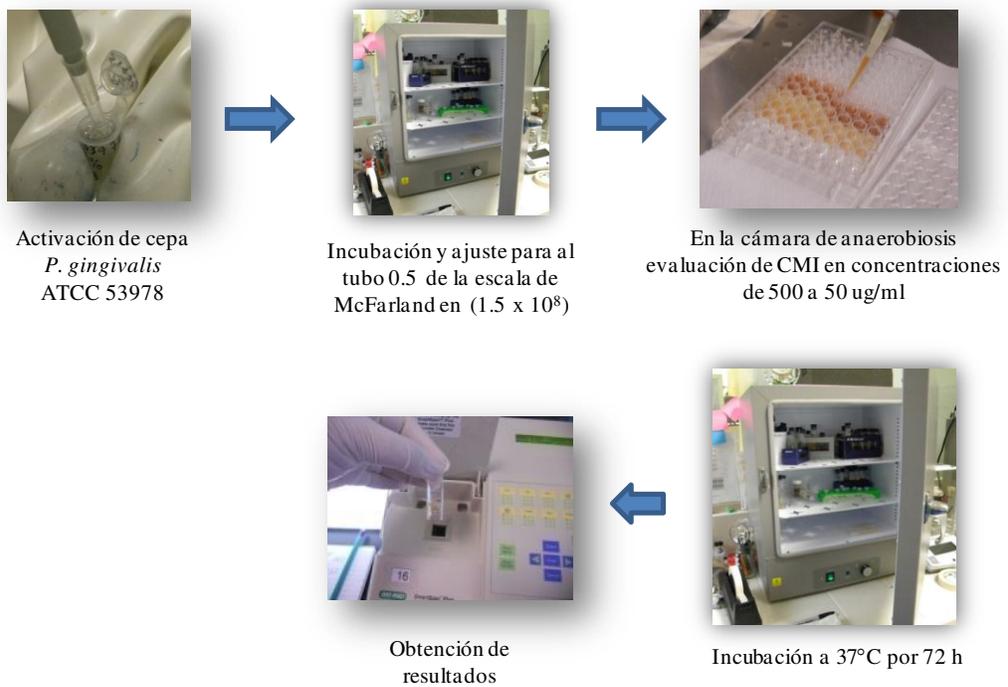


**Figura 11: Diagrama para la determinación de actividad de los extractos metanólicos sobre *P. gingivalis***

### **5.4.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria**

Se consideran los extractos que hayan presentado mayor actividad en la evaluación de difusión en disco para realizar la CMI, la cual fue determinada por la técnica de microdilución en placa de 96 pozos (Andrews JM. 2001). Las concentraciones a evaluar fueron 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50  $\mu\text{g/ml}$ , también fueron incluidas muestras blanco con medio de cultivo Mueller Hinton, medio con inóculo y medio con controles antes mencionados. Nuevamente mediante cámara de anaerobiosis fue depositado el inóculo ajustado a la escala 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$ ).

La placa fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 72 h, después de éste tiempo los tubos de ensayo se analizan considerando la absorbancia OD600 mediante el Espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus marca Bio-Rad  $\text{\textcircled{R}}$ . La menor absorbancia entre las concentraciones probadas, después de restar la turbidez misma del extracto por su concentración evaluada se considera que es la concentración mínima inhibitoria (CMI).



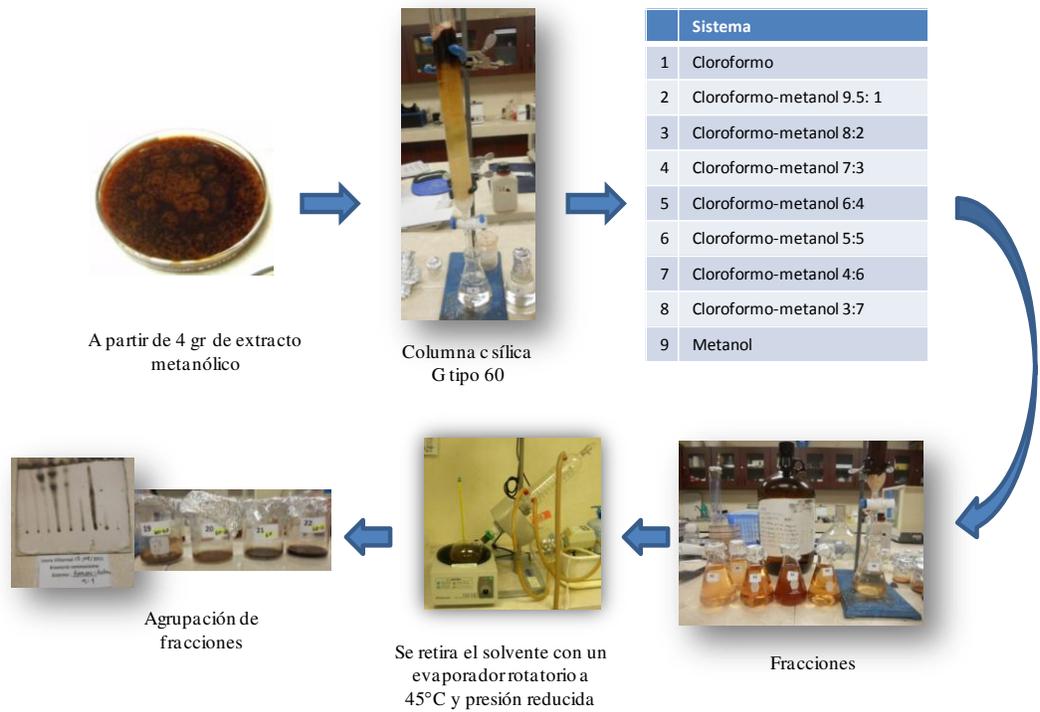
**Figura 11: Diagrama para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de extractos metanólicos sobre *P. gingivalis***

#### **5.4.4 Fraccionamiento mediante columna con el extracto de mayor actividad**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación antibacteriana y la CMI, se utilizan 4 g del extracto metanólico que haya presentado mayor actividad a menor dosis para inhibir la bacteria *P. gingivalis*.

Para el fraccionamiento en columna de sílica gel, se requiere empacar una torunda de algodón en la base de la columna, posteriormente 24.5 g de sílica 60 G y en la parte media el extracto, se procede a añadir eluentes de diferentes polaridades. El sistema inicial fue cloroformo, los subsecuentes consistieron en cloroformo-metanol 9.5:1, cloroformo-metanol 9:1, cloroformo-metanol 8.5:1.5, cloroformo-metanol 8:2, cloroformo-metanol 7:3, cloroformo-metanol 6:4, cloroformo-metanol 5:5, cloroformo-metanol 4:6, cloroformo-metanol 3:7 y finalmente metanol.

Las fracciones obtenidas fueron sometidas a un evaporador rotatorio a baja temperatura (40-45 ° C) y presión reducida (Marca Yamato, modelo BM 100) y agrupadas de acuerdo a su asociación en evaluación de cromatografías en capa fina para observar componentes semejantes.

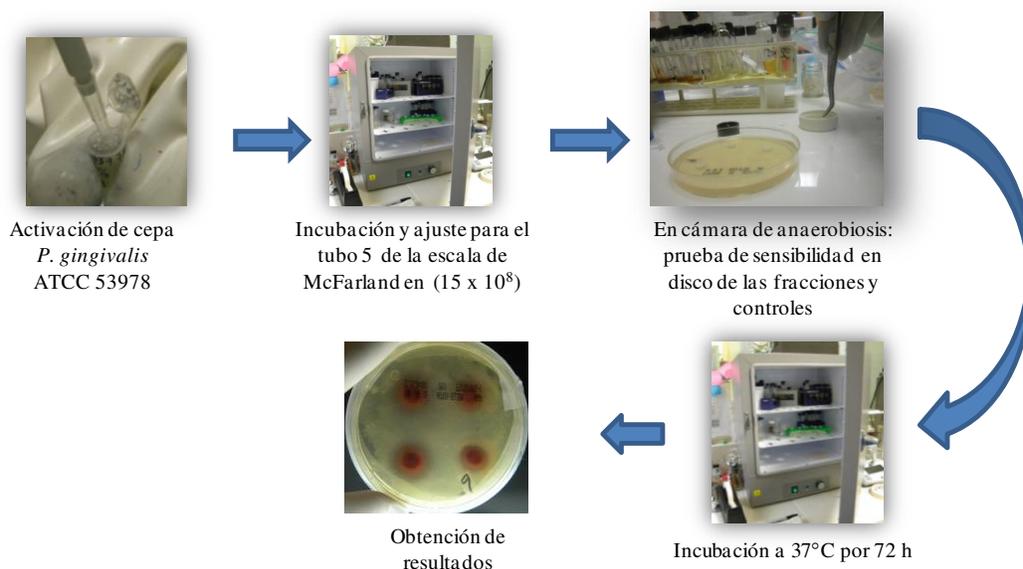


**Figura 13: Diagrama para la obtención de fracciones mediante columna de sílica gel**

#### 5.4.4.1 Evaluación mediante antibiograma de actividad bactericida a *P. gingivalis* con las fracciones obtenidas

Las fracciones obtenidas serán probadas sobre la cepa ATCC 53978 (*P. gingivalis* W-50) siguiendo la misma metodología realizada para la determinación de la actividad antibacteriana mediante la difusión en disco realizada a los extractos metanólicos al inicio del estudio.

Se colocaron cuatro sensidiscos de papel filtro estéril de Whatman #1 humedecido cada uno con 10 µl de las fracciones a evaluar, se utilizó la dosis obtenida en los resultados de la CMI del extracto.



**Figura 14: Diagrama para la determinación de actividad de las fracciones del extracto de mayor actividad sobre *P. gingivalis***

## **5.5 Evaluación de citotoxicidad de los extractos y fracciones de mayor actividad frente a *P.gingivalis***

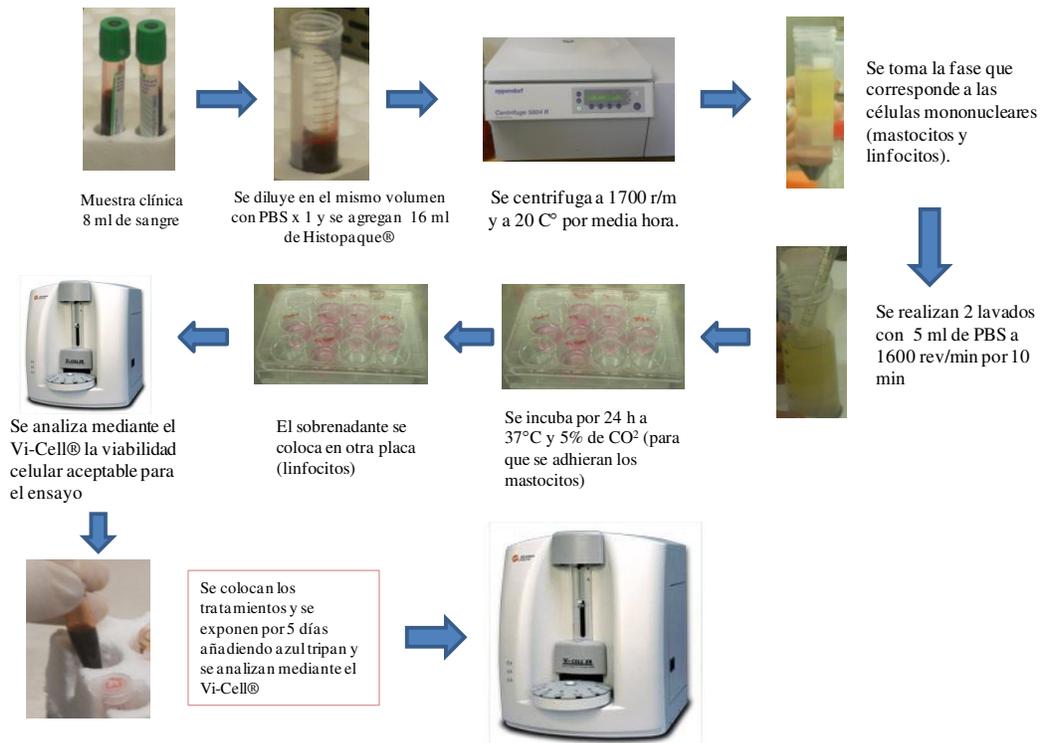
El extracto metanólico y las fracciones del mismo que resultaron con mayor actividad inhibitoria sobre la bacteria *P. gingivalis* en el ensayo previo, fueron evaluados para conocer su toxicidad sobre células mononucleares mediante la técnica de azul tripán y sobre fibroblastos humanos por medio de la técnica de rojo neutro.

### **5.5.1 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de azul tripán con células sanguíneas mononucleares**

Se utilizó el método de exclusión por azul de tripán según Repetto y Camean 1995. A partir de una muestra clínica de 8 ml de sangre, se agregó 16 ml de Histopaque® (Sigma) y centrifugado a 1700 r/m a 20° C por 30 min (marca Eppendorf, modelo 5804 R), a partir de la cual se toma la capa que corresponde a las células mononucleares (mastocitos y linfocitos), se realizan lavados con 5 ml de PBS a 1600 rev/min por 10 min.

Estas células aisladas son analizadas para determinar su viabilidad mediante el analizador Vi-Cell®, esperando que su viabilidad sea mayor al 90%. Las células se depositaron en una placa de 12 pozos, se incuban por 24 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para la adherencia de los mastocitos, después de toma el sobrenadante que corresponde a los linfocitos en otra placa de 12 pozos. Se colocan los tratamientos que resulten con mayor actividad a la concentración

mínima inhibitoria resultante, y sustancias control en este caso se utilizó DMSO (CTR Scientific) y una muestra blanco. Se exponen por 5 d a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se añade azul tripán al 0.4% (marca Gibco) para analizarse mediante el Vi-Cell® y valorar la cantidad de células que fueron afectadas.



**Figura 15: Diagrama para la evaluación de citotoxicidad en células mononucleares mediante la técnica de azul tripán**

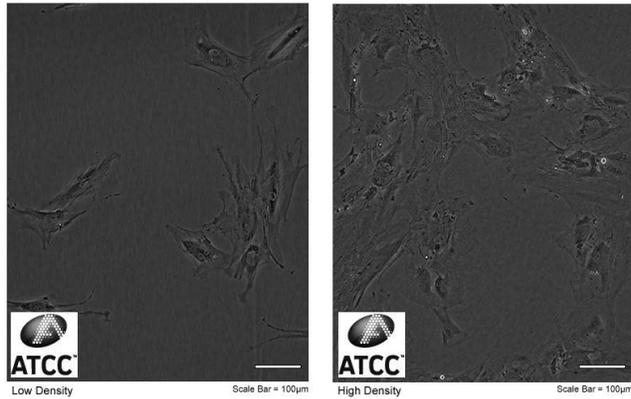
### **5.5.2 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de rojo neutro con fibroblastos**

Se obtuvo la línea celular ATCC CRL-7222 Hs 274.T, que corresponde a fibroblastos humanos. Las células fueron cultivadas en condiciones óptimas para su desarrollo, es decir; se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, en una estufa de humedad controlada y se les proporcionó además una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> mediante una incubadora con control de CO<sub>2</sub> (SHE L LAB® modelo TC2323)

Se utilizó el medio DMEM High Glucosa 1X (Marca Gibco®) y se realizaron lavados con PBS (Marca Gibco®); cada lavado fue realizado en una Campana de flujo laminar clase II (marca LABCONCO®). Una vez obtenido el crecimiento adecuado se tomaron  $5 \times 10^5$  células para cada prueba y fueron depositadas en placa de 24 pozos para leer su absorbancia de referencia con una longitud de 560 nm utilizando un lector de placas marca Biorad ® Modelo 550.

Se expusieron las sustancias problema por 24 h, los controles fueron DMSO al 10% (CTR Scientific) y Clorhexidina al 0.12% (Consepsis® Ultradent) luego se agregan 100µl de rojo neutro, se elimina mediante lavado con PBS el colorante no incorporado y luego se mide la absorbancia nuevamente el lector de placas.

ATCC Number: **CRL-7222**  
Designation: **Hs 274.T**



**Figura 16: Imagen proporcionada por ATCC de la línea celular utilizada en el ensayo (CTR-7222, Hs 274 T)**



**Figura 17: Diagrama para la evaluación de citotoxicidad en fibroblastos mediante la técnica de rojo neutro**

## 5.6 Evaluación de mutagenicidad mediante la prueba de Ames

Se activó la cepa de referencia *Salmonella typhimurim* TA100 contenida en el Kit Muta-Chromo Plate® con el medio de crecimiento incluido en el sistema del Kit; se incubó a 37°C por 18 h. Se disolvieron 100 mg de las fracciones y el extracto a evaluar con 0.5 ml de DMSO y agua destilada estéril hasta llegar a un volumen de 17.5 ml; posteriormente se filtraron por una membrana de 0.22 µm para su esterilización en frío. Se mezclaron los reactivos contenidos en el kit para preparar la solución madre, los cuales consisten en las siguientes sustancias:

A. Sales Davis-Mingioli sales (concentrado) 21.62 ml

B. D-glucosa 4.75 ml

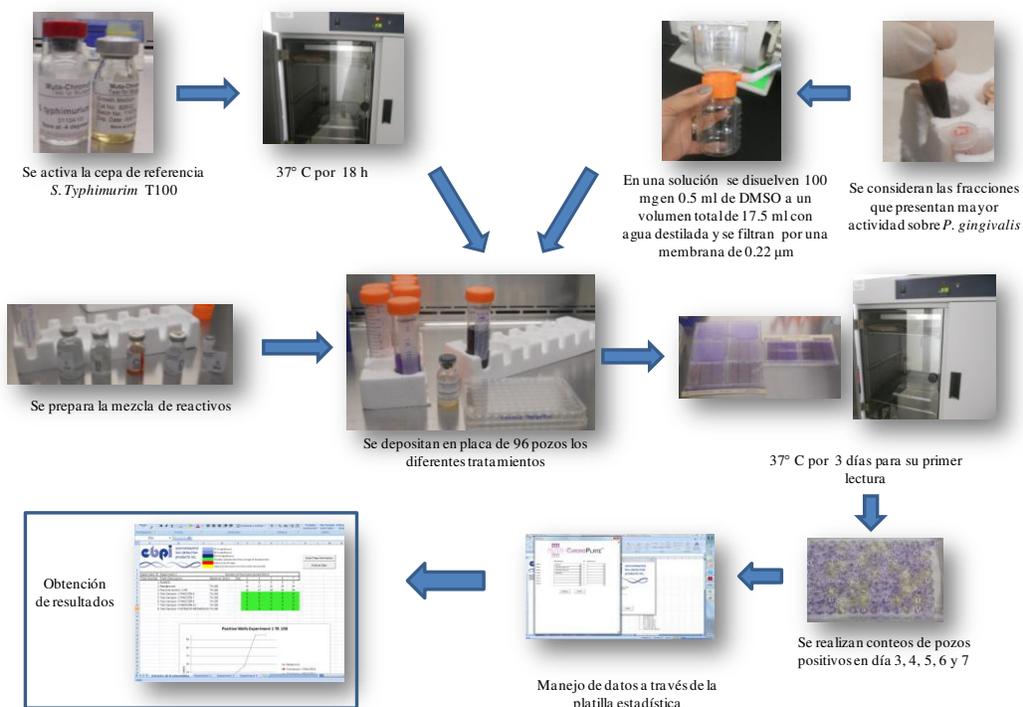
C. Púrpura de bromocresol 2.38 ml

D. D-Biotina 1.19 ml

E. L-Histidina 0.06 ml

El mutágeno estándar contenido en el sistema es el  $\text{NaN}_3$  a una concentración de 0.5µg /100 µl. Se utilizaron ocho placas de 96 pozos con los siguientes tratamientos: 1-blanco (prueba de esterilidad), 2-control negativo, 3-control positivo ( $\text{NaN}_3$ ), 4-Fracción 6, 5-Fracción 7, 6-Fracción 9, 7-Fracción 13 y 8- extracto metanólico de *K. ramosissima*. La concentración utilizada de las fracciones y extracto fue la considerada como concentración mínima inhibitoria.

Se contabilizaron los pozos positivos en las ocho placas, los 3, 4, 5, 6 y 7 d. Los resultados se analizan a través de un macro diseñado en Excel® provisto por el fabricante.



**Figura 18: Diagrama para la evaluación de mutagenicidad mediante la Prueba de Ames (Kit Muta-ChromoPlate®, por EBPI.**

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio

Los ejemplares fueron identificados por la Dra. Marcela González Álvarez en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con los siguientes registros:

Tabla I: Número de registro de especies de estudio

Espece vegetal	Número de registro
<i>Krameria ramosissima</i>	UANL-25525
<i>Larrea tridentata</i>	UANL-25524
<i>Jatropha dioica</i>	UANL-25526
<i>Leucophyllum frutescens</i>	UANL-25523

### 6.2 Rendimiento de extractos metanólicos

El cálculo del rendimiento es obtenido a partir del material seco utilizado y la diferencia del peso del extracto. Se obtuvieron cuatro extractos metanólicos en total, el porcentaje del rendimiento obtenido se presenta en la Tabla

II:

Tabla II: Porcentaje del rendimiento obtenido de los extractos metanólicos

Especie vegetal	Parte utilizada	Rendimiento obtenido (%)
<i>Krameria ramosissima</i>	Raíz	32
<i>Larrea tridentata</i>	Área	27
<i>Jatropha dioica</i>	Raíz	11
<i>Leucophyllum frutescens</i>	Área	15

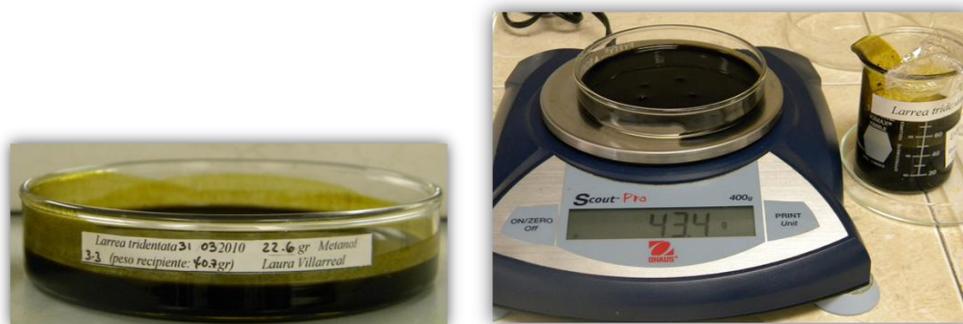


Figura 19: Extracto metanólico de *Larrea tridentata*

### 6.3 Caracterización química de los extractos metanólicos obtenidos

Los resultados de las pruebas químicas para los grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las especies evaluadas se encuentra en la Tabla III. Se encontró presencia de triterpenos, esteroides y metilesteroides, así como insaturaciones en todos los extractos analizados. Los flavonoides estuvieron presentes en tres de los extractos excepto en *L. tridentata*. Los compuestos alcaloides y cumarinas fueron detectados solo para *K. ramosissima*.

**Tabla III. Grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de las plantas en estudio**

Pruebas químicas	Extractos metanólicos			
	<i>J. dioica</i>	<i>K. ramosissima</i>	<i>L. frutescens</i>	<i>L. tridentata</i>
<b>Liebermann- Burchard</b> (triterpenos , esteroides y metilesteroides)	+	+	+	+
<b>Salkowski</b> (esteroides y metilesteroides)	-	+	+	+
<b>Shinoda</b> (flavonoide)	+	+	+	-
<b>Baljet</b> (sesquiterpenlactonas)	-	+	+	+
<b>Ácido sulfúrico</b> (flavonoide)	-	+	-	-
<b>Permanganato de potasio</b> (insaturaciones)	+	+	+	+
<b>Cloruro férrico</b> (oxhidrilos fenólicos)	-	+	-	+
<b>Molisch</b> (carbohidratos)	+	+	-	+
<b>Hidróxido de sodio al 10%</b> (cumarinas)	-	+	-	-
<b>Dragendorff</b> (alcaloides)	-	+	-	-

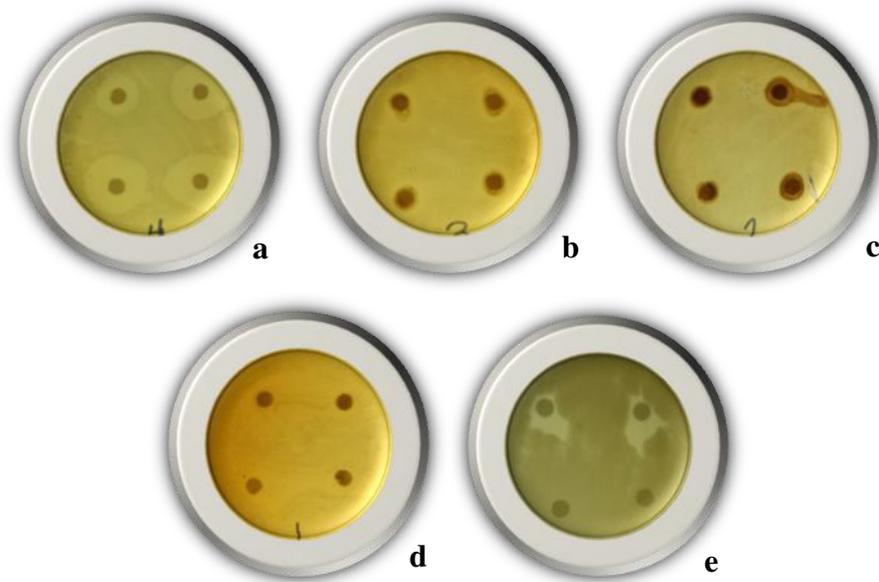
#### 6.4 Evaluación de actividad antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*

La determinación de la actividad antibacteriana sobre la cepa ATTC 53978 (*P. gingivalis* W-50) para los cuatro extractos metanólicos obtenidos es mostrada en la Tabla IV, presentando mayor inhibición el extracto que corresponde a la raíz de *Krameria ramosissima*. La actividad antimicrobiana fue obtenida de acuerdo a los halos de inhibición expresados en milímetros (mm).

**Tabla IV: Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos sobre *P. gingivalis***

<b>Especie vegetal</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Diámetro de la zona de inhibición (mm)</b>
<i>Krameria ramosissima</i>	Raíz	15.75 ± 0.50
<i>Larrea tridentata</i>	Área	6.25 ± 0.29
<i>Jatropha dioica</i>	Raíz	8.05 ± 0.40
<i>Leucophyllum frutescens</i>	Área	5.88 ± 0.25
Control positivo: Clorhexidina al 0.12%		12.25 ± 0.29
Control negativo: (DMSO al 5%)		5.75 ± 0.29

Valores expresados en promedios ± DS. (n=4)



**Figura 20: Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos para *Porphyromonas gingivalis***  
**a. *Krameria ramosissima*, b. *Larrea tridentata*, c. *Jatropha dioica*, d. *Leucophyllum frutescens*,**  
**e. Control positivo: Clorhexidina al 0.12%, Control negativo: DMSO al 5%**

#### **6.4.1 Obtención de fracciones del extracto metanólico de mayor actividad**

Según los resultados obtenidos el extracto metanólico de mayor inhibición fue elaborado de la raíz de *Krameria ramosissima*, por lo que se procedió al montaje de columna en sílica gel 60G, para la cual se utilizaron 4 g del extracto metanólico. Se utilizaron eluentes de diferentes polaridades, el sistema inicial fue cloroformo, los subsecuentes consistieron en cloroformo-metanol 9.5:1, cloroformo-metanol 9:1, cloroformo-metanol 8.5:1.5, cloroformo-metanol 8:2, cloroformo-metanol 7:3, cloroformo-metanol 6:4, cloroformo-metanol 1:1, cloroformo-metanol 4:6, cloroformo-metanol 3:7 y finalmente metanol.

Se obtuvieron un total de 90 fracciones, a las cuales se les realizó cromatografía en capa fina, se unieron las que tenían similitudes, quedando al final 14 fracciones a las que se les evaluó la actividad bactericida.

**Tabla V: Fracciones agrupada del extracto de *K. ramosissima* de acuerdo al sistema de extracción utilizado**

<b>Fracción agrupada</b>	<b>Sistema de extracción utilizado</b>
1	1: Cloroformo
2	1: Cloroformo y 2: Cloroformo-metanol 9.5: 1
3	2 :Cloroformo-metanol 9.5: 1 y 3: Cloroformo-metanol 8:2
4	2: Cloroformo-metanol 9.5: 1
5	4: Cloroformo-metanol 8.5: 1.5
6	5: Cloroformo-metanol 8:2
7	6: Cloroformo-metanol 7:3
8	6: Cloroformo-metanol 7:3 y 7: Cloroformo-metanol 6:4
9	7: Cloroformo-metanol 6:4
10	8: Cloroformo-metanol 1:1
11	9: Cloroformo-metanol 4:6
12	9: Cloroformo-metanol 4:6
13	10: Cloroformo-metanol 3:7
14	11: Metanol

### 6.4.2 Evaluación de actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de mayor actividad frente a *P. gingivalis*

Se realizó la metodología de difusión en disco para evaluar la inhibición de las 14 fracciones con la cepa ATTC 53978 (*P. gingivalis* W-50), la concentración utilizada fue de 300 µg/ml, donde se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla VI.

**Tabla VI: Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de *K. ramosissima* sobre *P. gingivalis***

Fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>K. ramosissima</i>	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
	3 d	7 d
1	9.67 ± 0.61	5.88 ± 1.08
2	11.78 ± 1.27	11.63 ± 0.75
3	10.55 ± 0.68	10.68 ± 1.04
4	9.91 ± 1.34	10.61 ± 1.11
5	10.83 ± 1.04	12.88 ± 0.85
6	14.11 ± 0.78	21.50 ± 1.29
7	19.70 ± 1.52	22.00 ± 1.41
8	10.85 ± 1.80	12.75 ± 1.50
9	16.64 ± 1.31	18.38 ± 1.38
10	12.70 ± 1.31	12.75 ± 0.96
11	13.00 ± 1.41	12.08 ± 0.83
12	14.25 ± 0.96	11.25 ± 1.50
13	17.75 ± 0.50	17.65 ± 0.47
14	11.25 ± 0.96	13.00 ± 0.82
Control Positivo: (Clorhexidina al 0.12%)	19.67 ± 1.21	17.50 ± 1.29
Control Negativo: (DMSO al 5%)	7.81 ± 1.29	5.25 ± 0.30

Valores expresados en promedios ± DS. (n=4)

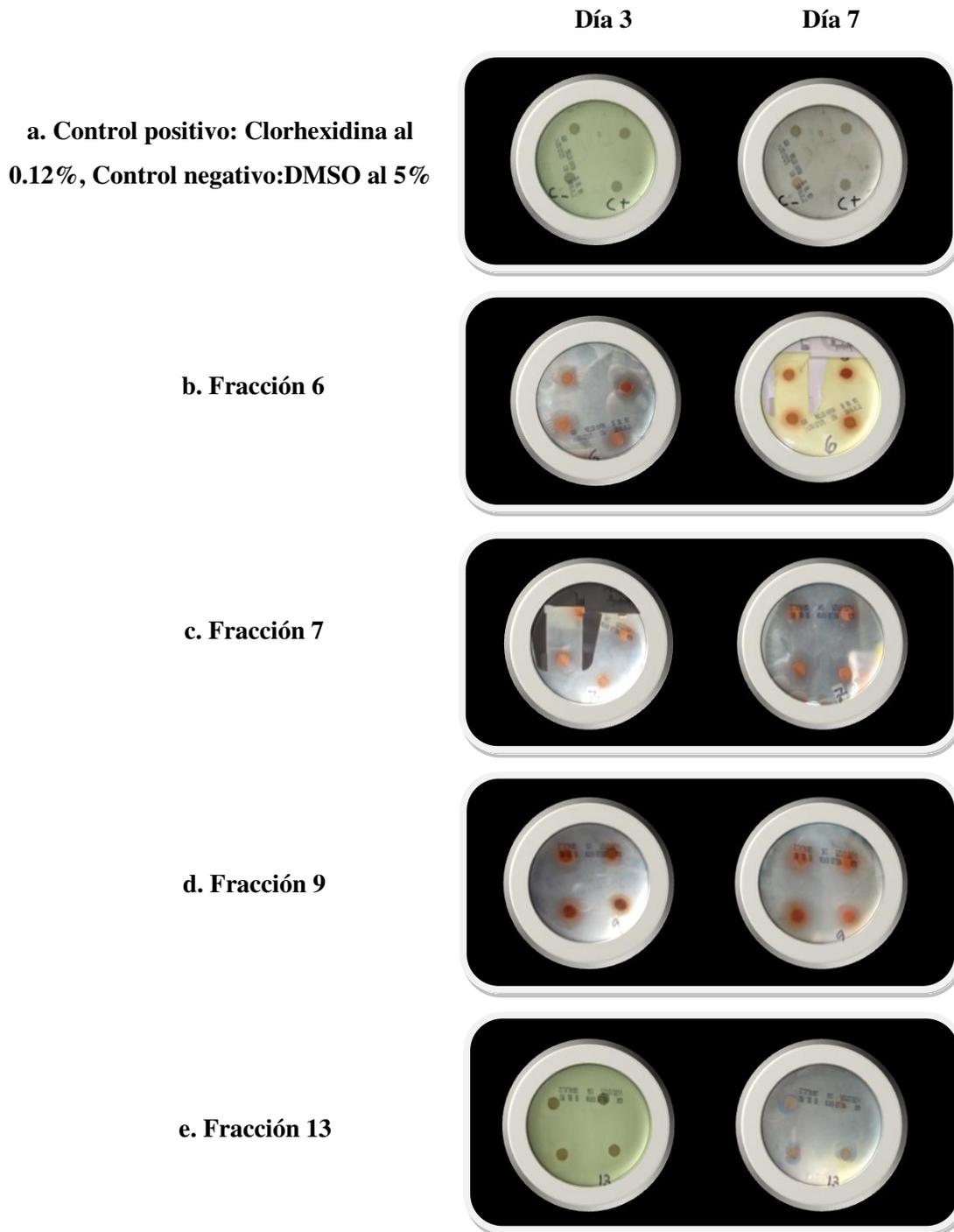


Figura 21: Efecto inhibitorio de mayor actividad de las fracciones del extracto metanólico de *Krameria ramosissima*

## 6.5. Caracterización química preliminar de las fracciones del extracto de mayor actividad

Se analizaron también las fracciones del extracto que resultaron con mayor actividad contra *Porphyromonas gingivalis*, a continuación se detallan los resultados en la Tabla IV. Los compuestos presentes en todas las fracciones son las sesquiterpenlactonas, compuestos de tipo flavonoides, insaturaciones, oxhidrilos fenólicos y carbohidratos. Las cumarinas se presentaron en todas las fracciones excepto para la fracción 13.

**Tabla VI. Grupos funcionales y metabolitos secundarios de las fracciones 6, 7, 9 y 13 de *Krameria ramosissima***

Pruebas químicas	Extracto metanólico de raíz de <i>Krameria ramosissima</i>			
	Fracción 6	Fracción 7	Fracción 9	Fracción 13
<b>Liebermann- Burchard</b> (tripterpenos , esteroides y metilesteroides)	-	-	+	-
<b>Salkowski</b> (esteroides y metilesteroides)	-	-	+	+
<b>Shinoda</b> (flavonoide)	-	-	+	-
<b>Prueba de Baljet</b> (sesquiterpenlactonas)	+	+	+	+
<b>Ácido sulfúrico</b> (flavonoide)	+	+	+	+
<b>Permanganato de potasio</b> (insaturaciones)	+	+	+	+
<b>Cloruro férrico</b> (oxhidrilos fenólicos)	+	+	+	+
<b>Molisch</b> (carbohidratos)	+	+	+	+
<b>Hidróxido de sodio al 10%</b> (cumarinas)	+	+	+	-
<b>Dragendorff</b> (alcaloides)	-	-	-	+

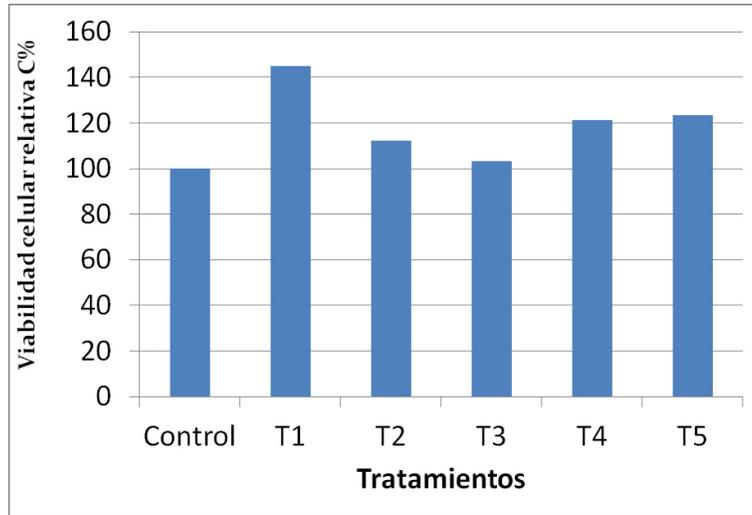
## **6.6. Evaluación de citotoxicidad de los extractos y fracciones de mayor actividad frente a *Porphyromonas gingivalis***

Se realizaron pruebas para evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de *Krameria ramosissima* y de las cuatro fracciones de este extracto que resultaron con mayor actividad antibacteriana frente a *P.gingivalis*. A continuación se detallan los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

### **6.6.1 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de azul tripán con células sanguíneas mononucleares**

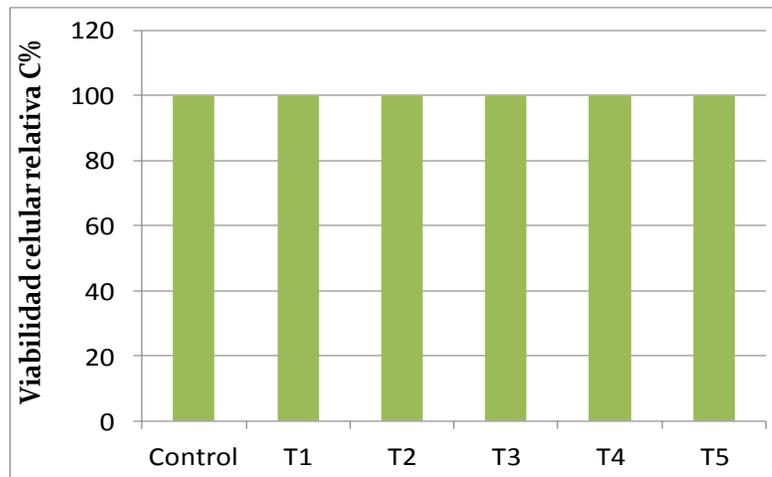
De acuerdo a los resultados obtenidos por la exposición del extracto y las fracciones de mayor actividad; se observó frente al lector de viabilidad celular Vi-Cell® con la tinción de azul de tripán que presentaron una viabilidad igual o mayor al 100% tanto en linfocitos como en mastocitos.

Se presentó una viabilidad mayor al 100 % en linfocitos se presentó en la Fracción 6, 7, 13 y en el extracto metanólico; en el caso de los mastocitos fue del 100 % en todos los casos. (Gráficas 1 y 2)



Control: DMSO, Tratamiento 1: Fracción 6, Tratamiento 2: Fracción 7, Tratamiento 3: Fracción 9, Tratamiento 4: Fracción 13, Tratamiento 5: Extracto metanólico de *K. ramosissima*

**Gráfica 1: Viabilidad celular en linfocitos mediante la exposición del extracto y fracciones de *Krameria ramosissima***

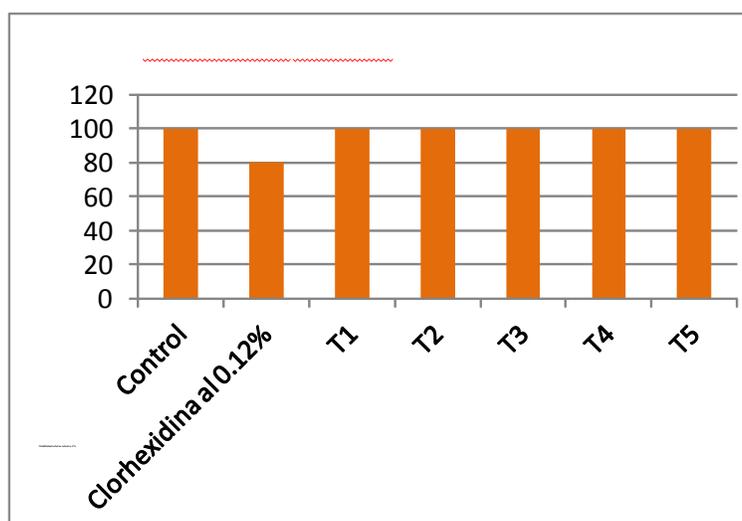


Conteo mayor a 200,000 células. Control: DMSO, Tratamiento 1: Fracción 6, Tratamiento 2: Fracción 7, Tratamiento 3: Fracción 9, Tratamiento 4: Fracción 13, Tratamiento 5: Extracto metanólico de *K. ramosissima*

**Gráfica 2: Viabilidad celular en mastocitos mediante la exposición del extracto y fracciones de *Krameria ramosissima***

### 6.6.2 Evaluación de citotoxicidad mediante la técnica de rojo neutro con fibroblastos

En los resultados obtenidos en la exposición sobre fibroblastos se observó que las membranas de las células se mantuvieron intactas, incluso se observó daño sobre éstas en la sustancia de actividad referida como antiséptico (Clorhexidina al 0.12%).

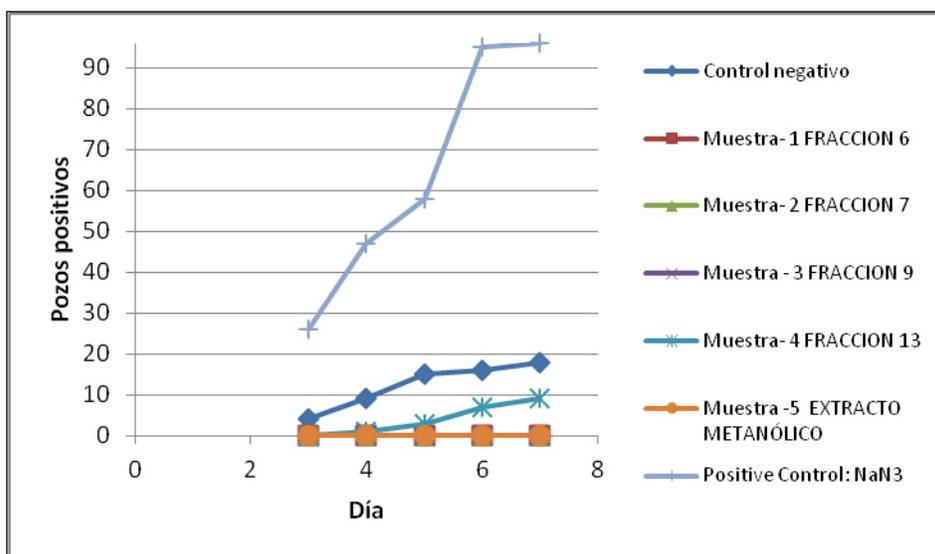


Control: DMSO, Antiséptico de referencia: Clorhexidina 0.12%,  
Tratamiento 1: Fracción 6, Tratamiento 2: Fracción 7, Tratamiento  
3: Fracción 9, Tratamiento 4: Fracción 13, Tratamiento 5:  
Extracto metanólico de *K. ramosissima*

**Gráfica 3: Viabilidad celular en fibroblastos mediante la exposición del extracto y fracciones de *Krameria ramosissima***

## 6.7 Evaluación de mutagenicidad mediante la prueba de Ames

Los resultados de acuerdo a las lecturas de los días 3 al 7 mostraron que las fracciones 6, 7, 9 y 13; y el extracto metanólico de *K. ramosissima* están por debajo del control positivo.



Control positivo:  $\text{NaN}_3$ , Control negativo: DMSO, Muestra 1: Fracción 6, Muestra 2: Fracción 7, Muestra 3: Fracción 9, Muestra 4: Fracción 13 y Muestra 5: Extracto metanólico de *K. ramosissima*.

Gráfica 4: Mutagenicidad para el extracto metanólico y fracciones de *Krameria ramosissima*

## 7. DISCUSIÓN

Considerando lo descrito por Liébana *et al* 2004, la enfermedad periodontal tiene un factor microbiológico importante, y el ambiente adecuado para que las bacterias relacionadas proliferen es favorecido porque el área subgingival es una zona con una baja tensión de oxígeno y por su localización carece de mecanismos de autolimpieza. Otro factor a considerar citado por Silva en 2003, es que el fluido gingival crevicular aporta nutrientes a los microorganismos colonizadores. Garza en 2009 concluye que estas condiciones expuestas en el huésped a lo largo del tiempo favorecen la aparición de la enfermedad, primero como gingivitis en una condición inflamatoria de tejidos blandos y posteriormente en periodontitis que es de condición crónica y con destrucción de tejidos de soporte.

En la descripción de la flora patógena relacionada con la enfermedad periodontal, Newman en 1990 relaciona la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *B. forsythus* con la progresión y el tratamiento no exitoso de la enfermedad periodontal, por lo que este estudio se propuso analizar *in vitro* la actividad de los extractos con una de estas bacterias: *P. gingivalis*.

Otros factor que determinó la selección de la bacteria de estudio fue que en evaluaciones recientes se ha confirmado la participación de *P.gingivalis* con

complicaciones de tipo sistémicas como inductor de lesiones coronarias (Brodala *et al* 2011), neumonía (Okuda *et al* 2005) y preclamsia (Contreras *et al* 2006).

En relación con el uso de plantas para combatir la enfermedad periodontal en la población mexicana Waizel-Bucay y Martínez en el 2011 realizan una investigación documental con lo reportado en estudios de etnobotánica, mencionando entre ellas a *J. dioica*, pero no hace referencia a las demás especies estudiadas en este trabajo.

La selección de las plantas evaluadas en este estudio se realizó considerando que fueran plantas nativas de la región del norte de México, ya que los resultados serían innovadores debido a que no se han registrado estudios específicos de éstas especies en relación con su actividad contra bacterias asociadas con la enfermedad periodontal.

Algunas de las especies vegetales que han sido estudiadas en su asociación con bacterias periodontales son *Punica granatum* (granada) en Menezes *et al* 2006 donde se utiliza un extracto hidroalcohólico en diferentes concentraciones como enjuague bucal, comparándolo con clorhexidina al 0.12%, su resultado presentó inhibición en los microorganismos componentes de placa dentobacteriana (incluyendo *P.gingivalis*). Este resultado obtenido a partir de muestras clínicas es similar al obtenido con *K. ramosissima* y en menor grado con *J. dioica*.

*Florenxia cernua* (hojasén), estudiada por Picasso quien en 2006, evaluó mediante bioautografía cuatro extractos metanólicos de diferentes plantas, sobre

bacterias periodontopatógenas: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Streptococcus intermedius*. Los resultados comprobaron que *F. cernua* inhibe el crecimiento *in vitro* de *P. gingivalis*, al igual que el resultado con el extracto metanólico de *K. ramosissima*.

Wolinsky *et al* en 1996 evaluaron el extracto acuoso de la corteza de *Azadirachta indica* (neem), en este se determinó la presencia de taninos y la inhibición de estreptococos orales que promueven la formación de placa dentobacteriana. Estos compuestos fueron previamente identificados en el estudio químico a *K. ramosissima* realizado por Verde-Star en 1987, donde se reportan resultados positivos a la prueba de Shinoda, Ácido sulfúrico y Cloruro férrico, infiriendo la presencia de taninos en el extracto y sus fracciones de mayor actividad.

Rodríguez-García *et al* en 2010 realizaron un estudio con *Croton lechleri* conocida como sangre de drago o sangre de grado, este nombre común lo comparte con una de las especies revisadas en este trabajo (*Jatropha dioica*), la cual no puede ser confundida con la especie *C. lechleri* que corresponde a una especie nativa de Centroamérica que se desarrolla como árbol, mientras que *J. dioica* es un arbusto de áreas semidesérticas. En el trabajo mencionado la evaluación *in vitro* del extracto de *C. lechleri* con biopolímeros (quitosa y pululano) como medio, presentó inhibición contra *P. gingivalis*, los resultados fueron contrastados con bacterias periodontopatógenas mediante determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida

(CMB) y también mediante la adhesión con biopelículas presentando inhibición en ambos materiales y siendo mayor en la película de quitosan. La inhibición en *C. lechleri*, es similar a la observada con el extracto de *K. ramosissima*.

En el caso de *Larrea tridentata* se encontró referencia de actividad contra bacterias relacionadas con enfermedad periodontal (Picasso, 2006), específicamente con *Bacteroides forsythus* y *Streptococcus intermedius*, sin embargo no se reportó actividad contra *Porphyromonas gingivalis* coincidiendo con el resultado obtenido en este estudio.

Los dos extractos metanólicos que presentaron mayor inhibición en la evaluación por sensibilidad en disco con *P. gingivalis* fueron *Jatropha dioica* y *Krameria ramosissima*, lo cual avala algunos de los usos comunes asociados contra el sangrado gingival (Achenbach *et al* 1986, Waizel-Bucay y Martínez, 2011), de éstos dos extractos el de mayor actividad fue el de *K. ramosissima*, además de presentar mayor rendimiento en su porcentaje de extracción (32%); por lo que la evaluación subsecuente se realizó solo con este extracto.

Jagan Rao *et al* 2012, describe la presencia de taninos entre sus componentes para *Krameria trianda* al igual que los resultados de encontrados en este estudio donde se encontró la presencia de taninos en el extracto metanólico y las fracciones de mayor actividad de *K. ramosissima*.

Las pruebas químicas realizadas al extracto metanólico de *K. ramosissima* resultaron positivas para: tripterpenos, esteroles y metilesteroles; flavonoides,

sesquiterpenlactonas, oxhidrilos fenólicos, carbohidratos, cumarinas y alcaloides, lo cual corresponde con lo descrito por Scholz y Rimpler en 1989.

La citotoxicidad de *K. ramosissima* fue reportada por Torres-González *et al* en el 2011 sobre línea celular de hepatoma humano (Huh7) utilizando el extracto hidroalcohólico de la parte aérea de la planta; sin embargo en el caso del presente estudio se utilizó la raíz para la elaboración del extracto, y las células expuestas fueron monocitos, linfocitos y fibroblastos humanos, resultando no citotóxico frente a estas células. Estos resultados infieren que posiblemente el extracto de *K. ramosissima* pueda ser tóxico para células tumorales pero no para células normales.

El efecto mutagénico de *K. ramosissima* mediante la prueba de Ames no fue encontrado en la búsqueda bibliográfica como referente específico. Vattuone *et al* en el 2004 presentaron un trabajo de la evaluación antimicrobiana de 20 plantas entre ellas *Krameria lappacea*, para la cual realizaron la prueba de mutagenicidad mediante el ensayo con *E. coli* WP2 encontrando que no hay actividad mutagénica. Otro referente asociado al género *Krameria* lo presenta O'Gara *et al* (1974) donde inducen sarcoma en ratas con el extracto y fracciones de *Krameria ixina* (sin considerar raíz de la planta), estos extractos produjeron sarcomas en el 100% de las ratas evaluadas, sin embargo al precipitar estos mismos extractos con cafeína para remover los taninos presentes, los extractos ya no estimularon la formación de sarcomas en las ratas. La evaluación mediante la prueba de Ames, es por tanto un referente no común para el género *Krameria* algunos de los estudios

donde reportan la genotoxicidad de extractos de plantas con la prueba de Ames son los reportados por Shimmer *et al* en 1994, Pereira *et al* 2003, Dantas *et al* 2003, Reid *et al* 2006; encontrando resultados positivos mediante la prueba de Ames para la corteza del árbol de pimienta (*Schinus terebinthifolius Raddi*), las especies de *Helichrysum simillimum*, *Helichrysum herbaceum* y *Helichrysum rugulosum*. En tanto que en el presente estudio la prueba de Ames para genotoxicidad resultó negativa para el extracto metanólico de *K. ramosissima* y sus fracciones.

## 8. CONCLUSIONES

- El rendimiento de los extractos metanólicos de *J. dioica*, *K. ramosissima*, *L. frutescens* y *L. tridentata* fue de 17 a 32 %, el mayor lo presentó la raíz de *K. ramosissima*.
- Los extractos metanólicos de *J. dioica*, *K. ramosissima*, *L. frutescens* y *L. tridentata* mostraron presencia de triterpenos, esteroles y metilesteroles e insaturaciones.
- El extracto metanólico de la raíz de *K. ramosissima* a una concentración de 300 µg/ml , fue el que mostró mayor actividad contra *P. gingivalis* con una inhibición de  $15.75 \pm 0.50$  mm.
- Del extracto con mayor actividad (*K. ramosissima*) se obtuvieron 90 fracciones y se reagruparon en 14, a las cuales se les evaluó la actividad biológica y se encontró que 4 de ellas (fracción 6, 7, 9 y 13) presentaron actividad relevante sobre *P. gingivalis* con un halo de inhibición de 17.6 – 22.0 mm, mayor al control positivo clorhexidina (17.5 mm)
- Las fracciones de *K. ramosissima* con mayor actividad (6, 7, 9 y 13) contra *P. gingivalis*, no mostraron daño celular sobre linfocitos y mastocitos por lo que se concluye que no son tóxicas.

- El extracto metanólico y las fracciones de *K. ramosissima* con mayor actividad (6, 7, 9 y 13) contra *P. gingivalis* no presentaron mutagenicidad mediante la prueba de Ames.
  
- **El extracto metanólico de raíz de *K. ramosissima* así como las fracciones identificadas con mayor inhibición frente a *P. gingivalis*, son una alternativa segura para su inclusión en estudios clínicos para la prevención y manejo terapéutico de la enfermedad periodontal.**

## 9. LITERATURA CITADA

- Achenbach H, Grob J, Domínguez X A, Verde Star J, Salgado F. 1987. Ramosissin and other methoxylated nor-neolignans from *Krameria ramosissima*. *Phytochemistry*. 26(7):2041-2043.
- Alanís Flores G J, González Alanís D. 2003. Flora nativa ornamental. Para el area metropolitana de Monterrey. Editado por: Universidad Autónoma de Nuevo León y R. Ayuntamiento de Monterrey 2000-2003. Primera Edición.
- Alanís-Garza B, Salazar-Aranda R, Ramírez-Durón R, Garza-González E, Waksman de Torres N. 2012. A new antimycobacterial furanolignan from *Leucophyllum frutescens*. *Natural product communications*. 7: 597-598.
- Alderman S, Kailas S, Goldfarb S, Singaram C, Malone D G. 1994. Cholestatic hepatitis after ingestion of chaparral leaf: confirmation by endoscopic retrograde cholangiopancreatography and liver biopsy. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 19(3):242-247.
- Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Sánchez-Vargas LO, Lara-Córdoba M, Alcántara-Maruri E, Ximénez-Fyvi LA. 2005. Descripción de la microbiota subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica. *Revista Odontológica Mexicana*. 9: 7-15.

Ames B N, McCann J & Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *the salmonella/mammalian*-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31:347-364.

Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimic. Chemotherapy* 48: 5 -16

Arroyo J, Prashad M, Vásquez Y, Pi E, Tomás C.2005. Actividad citotóxica in vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Rev Peru Med Exp Sald Pública.* 22 (4): 247-253.

Balderas-Renteria I, Camacho-Corona M R, Carranza-Rosales P, Lozano-Garza H G, Castillo-Nava D, Alvarez-Mendoza F J, Tamez-Cantú E M. 2007. Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbón tetrachloride. *Annals of Hepatology.* 6(4): 251-254.

Batchelor WB , Heathcote J , Wanless I R. 1995. Chaparral-induced hepatic injury. *American Journal of Gastroenterology.* 90(5):831-833.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Tuck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method standard. *Am J Clin Pathol* 45: 493 - 496.

Bonet MA & Vallés J (2002). Use of non-crop food vascular plants in Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula). *Int J Food Sci Nutr* 53: 225 - 248.

Brodala N, Merricks E P, Bellinger D A, Damronsgri D, Offenbacher S, Beck J, Madianos P, Sotres D, Chang Y-L, Koch G, Nichols T C. 2005. *Porphyromonas gingivalis* Bacteremia Induces Coronary and Aortic Atherosclerosis in Normocholesterolemic and Hypercholesterolemic Pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1446-1451.

Chitturi, S. and Farrell, G. C. 2000. Herbal hepatotoxicity: An expanding but poorly defined problem. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15: 1093–1099.

Contreras A, Herrera JA, Soto JE y cols. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. *Journal of Periodontology*. 2006; 77: 182-188.

Cordero Camacho C P, Aristizábal Gutierrez F A. 2012 Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1). Consultado el noviembre 16, 2012, de: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30098>

Dantas M C, Varela F N, Agnez-Lima L F, Batistuzzo R. 2003. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 42 (3):185-191.

Di Pierro F, Catacchio V, Candidi C, Zerbinati N, Alfonso R. 2009. Rhatany-based preparation in vulvovaginitis and vaginosis. *Gazz Med Ital-ArchSci Med.* 168: 330-346.

Domínguez X. A., 1979. *Fitoquímica.* 1ª Edición, Editorial Limusa. México D. F. pp. 94.

Enrile de Rojas FJ, Santos Alemany A. 2005. Colutorios para el control de la placa y gingivitis basados en evidencia científica. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España.* 10:445-452.

Freshney, I. 2000. Cytotoxicity. En: *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* John Wiley and Sons Inc., Reino Unido, 329-343.

Garza Enriquez M. 2009. Índice de enfermedad periodontal en adultos de 20 a 74 años en el estado de Nuevo León, México. Tesis para obtener el grado de doctor en investigación odontológica. Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, España-

Gianelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. 2008. Effect of Chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol. In Vitro* 22:308-317.

Hall G S. 2007. *Anaerobic Bacteriology.* En García L S: *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* 2 Edición. Ed. ASM Press. EUA.

Hoffmann G. 1996. Genetic toxicology. En: Toxicology: the basic science of poisons. 5 Ed. New York. EU.

Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pisal SS. 2004. Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Diseases. Drug Development and Industrial Pharmacy. 30: 195–203.

Jagan Rao N, Subash K R, Sandeep Kumar K. 2012. Role of Phytotherapy in Gingivitis: A Review. International Journal of Pharmacology, 8: 1-5.

Liébana J, Castillo AM, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2004;9 Suppl:S75-91.

Lira-Saldívar R H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidad de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(2): 214-222.

López V. 2011. Are traditional medicinal plants and ethnobotany still valuable approaches in pharmaceutical research? Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(1): 3-10

Manzanero-Medina G I, Flores-Martínez A, Sandoval-Zapotitla E, Bye-Boettler, R. 2009. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. Polibotánica, 27: 191-228.

Maupomé G, Soto-Rojas A, Borges-Yáñez A, Irigoyen-Camacho ME, Martínez-Mier A. 2007. Prevención en salud periodontal: Recomendaciones actualizadas y estatus del conocimiento directamente aplicable al entorno mexicano. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*. 44: 25-33.

McClatchey WC, Mahady GB, Bennett BC, Shiels L, Savo V 2009. Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. *Pharmacol Ther* 123: 239 - 254.

Menezes SM, Nunes LC, Glauce BS, Viana SB. 2006. *Punica granatum* (Pomegranate) Extract Is Active Against Dental Plaque. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 6: 79-92.

Molina Salinas GM. 2004. Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostáticas de plantas del noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogoresistentes. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias con especialidad en Química Biomédica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Montemayor Villarreal Y J. 2004 Efecto antimicrobiano de extractos de plantas ante microorganismos periodontopatógenos. Tesis para obtener el grado de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología de la Universidad de Nuevo León.

Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Naoya O, Shoji M, Yukitake H, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Nakayama T. 2008. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83. Revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. DNA Res. 15, 215–225.

Navarrete M, Silva A, Sanz M, Vernal R. 2010. Variabilidad de la síntesis de RANKL por linfocitos T frente a distintos serotipos capsulares de *Porphyromonas gingivalis*. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehab. Oral Vol. 3(1); 19-23.

Newman H N. 1990. Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology. J. Clin. Periodontol. 17: 533-541.

Nigenda G, Mora-Flores G, Aldama-López S, Orozco-Núñez. 2001. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: El dilema entre regulación y tolerancia. Salud Publica Mex. 43:41-51.

Noiri Y, Li L, Yoshimura F, Ebisu S. 2004. Localization of *Porphyromonas gingivalis*-carrying fimbriae in situ in Human Periodontal pockets. J Dent Res. 83(12): 941-945.

Okuda K, Kimizuka R, Abe S, Kato T, Ishihara K. 2005. Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. Journal of Periodontology. 76 (11): 2154-2160.

Pereira R C, Batistuzzo S R, da Silva C, Barbosa-Filho J M, Agnez-Lima L. 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*. 536. 117-120.

Picasso González K C. 2006. Localización de compuestos con efecto antimicrobiano de *Fluorencia cernua*, *Larrea tridentata* y *Caléndula officinalis*, sobre *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Streptococcus intermedius*. Tesis para obtención de grado de licenciatura de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología, UANL.

Rakshit K D, Harinder P S, Makkar K B. 2010. *Jatropha* toxicity: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 13:476–507.

Rakshit K D, Harinder P S, Makkar K B. 2011. *Jatropha* Diterpenes: a Review. *J Am Oil Chem Soc*. 88:301–322.

Reid K A, Maes J, Maes A, Van Staden J, De Kimpe N, Mulholland D A, Verschaeve L. 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 106 (1): 44-50.

Rodríguez-García A, Galán-Wong LJ, Arévalo-Niño K. 2010. Development and in vitro evaluation of biopolymers as a delivery system against periodontopathogen microorganisms. *Acta Odontol. Latinoam*. 23 (2): 1201-1206.

Romero Cerecero O, Reyes Morales H, Herrera Arellano A, Lozoya Legorreta X, Tortoriello J. 2004. Aceptación de los fitofármacos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. Rev Med IMSS; 42 (2): 125-130.

Rzedowski, J. y Calderon G. 1994. Zygothylaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 30. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Sánchez-Lamar A, Fonseca-López G, Capiro-Trujillo N, Fernández-Fuentes D. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Rev Cubana Farm. [online]. 2000, vol.34, n.1, pp. 34-43. ISSN 1561-2988.

Sandoval Villasana, A. M. 1998. Estandarización de dos técnicas analíticas para la determinación de mutágenos empleando *Salmonella typhimurium*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

Schimmer O O, Krüger A A, Paulini H H , Haefele F F. 1994. An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. Pharmazie. 49(6):448-451.

Scholz E, Rimpler H.1989. Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. Planta Med. 55(4): 379-384.

Sheikh N M, Philen R M, Love L A. 1997. Chaparral-associated hepatotoxicity. *Arch Intern Med.* 157 (8): 913-919.

Silva N. 2003. Microbiología de la Enfermedad Periodontal. *Revista Chilena de Tecnología Médica* 23: 1088–1092.

Simpson B. 1991. The past and present uses of Rhatany (*Krameria*, *Krameriaceae*). *Economic Botany.* 45(3):397-409.

Southern EN, Gayle BM, Tolle SL, Marinak K. 2006. The Comparative Effects of 0.12% Chlorhexidine and Herbal Oral Rinse on Dental Plaque-Induced Gingivitis. *Journal of Dental Hygiene.* 80: 1-9.

Steinmann V W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia *Euphorbiaceae* en México. *Acta Botánica Mexicana.* 61: 61-63.

Taddei-Bringas GA, Santillana-Macedo MA, Romero-Cancio JA, Romero-Téllez MB. 1999. Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Publica Mex;*41:216-220.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. 2007. Objetivos microbiológicos del tratamiento periodontal. *Periodontology 2000 (Ed Esp)* 17: 180-218.

Torres-Capetillo E, Carrillo-Fuentevilla R, De la Garza-Ramos M A, Mercado Hernández R, Torre-Martínez H H H y Segoviano-Ramirez J C. 2013. Antimicrobial efficacy of neutral super-oxidized electrolyzed gel versus

chlorhexidine digluconate 0.12% in biofilm formation on orthodontic miniimplants: An in vitro study. *J. Pharmacognosy Phytother.* 5(4): 64-71.

Torres-González L, Muñoz-Espinosa L E, Rivas-Estilla AM, Trujillo-Murillo K, Salazar-Aranda R, Waksman N, Cordero-Pérez P.2011. Protective effect of four Mexican plants against CCl<sub>4</sub>-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Annals of Hepatology.* 10(1):73-79.

Turner N (1995). Ethnobotany today in non-western North America. In *Ethnobotany: evolution of a discipline*, pp.264-283.

Vattuone, M.A.; Jaime, G.S.; Soberón, J.R.; Martínez Arriazu, M.E.; Sampietro, D.A.; Sgariglia, M.A.; Sgroi, N.; Selis, A.N.; Quiroga, E.N.Velázquez.2004. Evaluación de especies vegetales como fuentes naturales de antimicrobianos y antioxidantes. *Memorias de la XXI Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán*. Consultado en enero 2003. Disponible en: [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=20645&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=16653](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=20645&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=16653).

Herrera N P, Reyes Sánchez R, Mata M, Llamosas E. 2006. La enfermedad periodontal en diversas poblaciones del México prehispánico. *Revista ADM* 2006; 63(6):225-230.

Verde Star MJ. 1987. Estudio químico de *Krameria cytisoides*, *K.ramosissima*, *K. sonora*, *K. grayi*, *Tiquilia canescens*, *Petalonyx crenatus* y *Kallstroemia maxima*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. División

de Ciencias y Humanidades. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. México.

Waizel-Bucay J, Martínez I. 2007. Plantas empleadas en odontalgias I. Revista Asociación Dental Mexicana. 64:173-186.

Waizel-Bucay J, Martínez I. 2011. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. Revista Asociación Dental Mexicana. 68(2): 73-88.

Wolinsky LE, Mania S, Nachnani S y Ling S. 1996. The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon bacterial properties influencing *in vitro* plaque formation. J Dent Res 75(2): 816-822.

Wong-Paz J E, Castillo-Inunguray M, López-López LI, Contreras-Esquivel J C, Nevárez-Moorillon G V, Aguilar C N. 2010. *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2 (4). Obtenido de: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM4/Japtropa%20dioica%20Jorge%20Wong-Paz.pdf>

Zhang X P, Zhang M L, Su X H, Huo C H, Gu Y C., Shi Q W. 2009. Chemical Constituents of the Plants from Genus *Jatropha*. Chemistry & Biodiversity, 6:2166–2183.

## **10. APÉNDICES**

## 10.1 Resumen curricular

Laura Elena Villarreal García

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Acentuación en  
Química de Productos Naturales

Tesis: POTENCIAL ANTIBACTERIAL, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y MUTAGÉNICA DE *Krameria ramosissima*, *Larrea tridentata*, *Jatropha dioica* y *Leucophyllum frutescens*

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 17 de Junio de 1980, hija de Juan Raúl Villarreal Ramos y María Elena García Ramírez

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2002. Facultad de Odontología. Maestría en Salud Pública en 2006. Facultad de Salud Pública y Nutrición. UANL.

Experiencia Profesional: Práctica profesional como Cirujano Dentista del 2003 a la fecha. Profesor de las Unidades de Aprendizaje de Farmacología Básica, Epidemiología Bucal y Ambiente y Sustentabilidad en el Programa de Estudios de Cirujano Dentista del 2003 a la fecha.

Publicaciones: 1

## **10.2 Artículo**

Neolignanos de *Krameria ramosissima* (A. Gray) S. Watson con actividad contra *Porphyromonas gingivalis*, evaluación citotóxica y mutagénica

Neolignans from *Krameria ramosissima* (A. Gray) S. Watson with activity against *Porphyromonas gingivalis*, cytotoxic and mutagenic evaluation

Trabajo científico

Laura E. Villarreal-García,<sup>1</sup> Azucena Oranday-Cárdenas,<sup>1</sup> Myriam A. de la Garza-Ramos,<sup>2</sup> Catalina Rivas-Morales,<sup>1</sup> M. Julia Verde-Star,<sup>1</sup> J. Alberto Gómez-Treviño,<sup>3</sup> Víctor Torres de la Cruz<sup>4</sup>

1. Departamento de Química, Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

2. Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud. Laboratorio de Investigación Odontología Integral y Especialidades. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

3. Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

4.- Laboratorio de Proteómica, Departamento de Genética Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Correspondencia:

CD Laura Elena Villarreal García MSP

Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

Pedro de Alba S/n Ciudad Universitaria, CP. 66450

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

Tel (81)83294000 ext. 3161

Correo electrónico: villarrealgarcia@gmail.com

Resumen

*Porphyromonas gingivalis*, es una de las bacterias asociadas a la enfermedad periodontal, y ha sido relacionada con lesiones coronarias, neumonía y preeclamsia. El propósito de este estudio fue evaluar el extracto metanólico de raíces de *Krameria ramosissima* contra *P. gingivalis* (ATCC 53978), determinar su actividad citotóxica en fibroblastos humanos (ATCC CRL-7222 Hs 274.T) y su potencial mutagénico mediante la prueba de Ames. La concentración mínima inhibitoria del extracto fue de 300 µg/mL. Mediante cromatografía en columna se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales la 7 y la 9 presentaron mayor actividad ( $P < 0.05$ ). Se identificaron por espectroscopía de masas dos neolignanos en las fracciones 7 y 9 con pesos moleculares de 314 y 296 respectivamente. El extracto y las fracciones activas fueron negativas en las pruebas de citotoxicidad y mutagenicidad.

Palabras clave: *Krameria ramosissima*, neolignanos, *Porphyromonas gingivalis*, citotoxicidad, mutagenicidad

## Abstract

*Porphyromonas gingivalis*, is one of the bacteria associated with periodontal disease, and has been related to coronary lesions, pneumonia and preeclampsia. The purpose of this study was to evaluate methanol extract of root *Krameria ramosissima* against bacteria *P. gingivalis* (ATCC 53978), determine their cytotoxic activity in human fibroblasts (ATCC CRL-7222 Hs 274.T) and mutagenic potential using the Ames test. The minimum inhibitory concentration of the extract was 300 µg/mL. By column chromatography were obtained 14 fractions, of which the 7 and the 9 had greater activity ( $P < 0.05$ ). Were identified by mass spectroscopy two neolignans in fractions 7 and 9 with molecular weights of 314 and 296 respectively. The extract and the active fractions were negative in mutagenicity and cytotoxicity tests.

Keys words: *Krameria ramosissima*, neolignans, *Porphyromonas gingivalis*, cytotoxic, mutageneses

## Introducción

En las últimas décadas se ha incrementado el interés de la comunidad científica en el estudio de plantas medicinales debido a que son una fuente importante de principios activos, se calcula que el 30% de los fármacos empleados en los países industrializados se han sintetizado a partir de productos vegetales.<sup>1,2</sup>

El término etnofarmacología se registra por primera vez en 1967 en el título del libro: "*Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs*",<sup>3</sup> donde se mencionan los usos en la medicina tradicional de sustancias naturales con propiedades alucinógenas y explica cómo los productos naturales han sido el origen de fármacos con estas aplicaciones. Actualmente se considera que el concepto de etnofarmacología incluye la

observación, identificación, descripción e investigación experimental de forma interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos que han sido tradicionalmente empleados u observados por el hombre.<sup>4</sup>

Se consideró en el presente estudio como antecedente la referencia del uso tradicional en comunidades del norte de México de las raíces de *Krameria ramosissima*, la cual ha sido utilizada como astringente y antibacteriano en enfermedades de la cavidad oral, especialmente en la gingivitis y periodontitis.<sup>5</sup>

La especie de *Krameria ramosissima* (A. Gray) S. Watson, también conocida como calderona o ratania, es un arbusto generalmente menor a 60 cm, difusamente ramificado y rígido, algunas veces casi postrado.<sup>6</sup> Geográficamente se distribuye en el sur y oeste de Texas en EUA y en los estados de Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León en México.<sup>6,7</sup> Las raíces del género *Krameria* son comercialmente utilizadas para teñir lana y pieles con tonos rojo y café rojizo, así como para la manufactura de tintas y colorantes en vinos.<sup>5</sup> En Sudamérica se han utilizado para la elaboración de dentífricos especialmente las especies *K. lappacea* y *K. triandra*.<sup>8</sup> Algunos estudios reportan actividad de algunas variedades de éste género vegetal en tratamientos para vulvovaginitis,<sup>9</sup> colitis,<sup>10</sup> cáncer en intestino, estómago y lengua.<sup>11</sup>

En relación con la especie de interés *K. ramosissima*, no se encontraron estudios científicos que permitan conocer si presenta actividad antibacteriana, sin embargo se consideró su uso etnobotánico y las actividades antibacterianas reportadas en otras especies del mismo género.<sup>8</sup> Para la evaluación antibacteriana se seleccionó la bacteria anaerobia *Porphyromonas gingivalis* reconocida como una de las principales bacterias que lesionan los tejidos periodontales,<sup>12,13</sup> además de ser relacionada con enfermedades sistémicas tales como inductora de lesiones coronarias,<sup>14</sup> en neumonía,<sup>15</sup> y preeclampsia.<sup>16</sup>

En cuanto a la identificación de compuestos dentro de los extractos del género *Krameria*, se han documentado neolignanos,<sup>17-20</sup> los cuales son de interés biológico ya que algunos lignanos se asocian con actividad bactericida, fungicida y antitumoral.

El reconocer la actividad *in vitro* con la bacteria de interés, así como el fraccionamiento del extracto de la raíz de *K. ramosissima* mediante cromatografía en columna para su evaluación específica e identificación de presencia de compuestos químicos, además de su análisis citotóxico y mutagénico, permitirán contribuir con el conocimiento de esta especie vegetal, considerando su viabilidad como agente antiinfeccioso de la cavidad oral.

## Material y métodos

### Material biológico

Se utilizó la cepa *P. gingivalis* (ATCC 53978) para la evaluación antibacteriana y la cepa *Salmonella typhimurim* TA100 requerida para la prueba de mutagenicidad, ambas fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Investigación en Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La línea celular utilizada en la evaluación de citotoxicidad fue la ATCC CRL-7222 Hs 274.T correspondiente a fibroblastos humanos, la cual fue provista por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas, de la misma Universidad.

### Material vegetal

Las raíces de *K. ramosissima* se obtuvieron en el municipio de Cadereyta, Nuevo León, México en febrero de 2010. Una muestra de esta planta fue identificada, y se ha resguardado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el número de registro: 25525.

## Preparación del material vegetal y obtención del extracto

El material vegetal fue lavado, las raíces cortadas en tramos pequeños de 1 a 2 cm de largo, y posteriormente sometidos a un horno a 40°C durante 48 h (Felisa® modelo FE-295V). Una vez secas, las muestras fueron trituradas por separado en un molino manual marca Victoria® y almacenadas en un recipiente seco.

Para la elaboración del extracto, se pesaron 300 g de raíces, se colocaron en un Soxhlet, por 18 h con 500 ml de metanol (CTR Scientific®). El extracto se concentró en un evaporador rotatorio a baja temperatura (40-45 °C) y presión reducida (Yamato®, modelo BM 100).<sup>21</sup> El extracto resultante fue pesado y envasado en viales de vidrio color ámbar y refrigerados a 4°C hasta su uso. Para calcular el rendimiento se dividió el peso del extracto obtenido entre el peso inicial del material vegetal y el resultado se multiplica por 100, obteniendo así el porcentaje de rendimiento.<sup>22</sup>

## Obtención de fracciones a través de cromatografía en columna

Del extracto metanólico resultante se utilizaron 4 g para incorporarse en una columna cromatográfica con 24.5 g de sílica gel G tipo 60. Se pasaron a través de la columna diferentes eluentes, el sistema inicial fue cloroformo, los subsecuentes consistieron en: cloroformo-metanol 9.5:1, cloroformo-metanol 9:1, cloroformo-metanol 8.5:1.5, cloroformo-metanol 8:2, cloroformo-metanol 7:3, cloroformo-metanol 6:4, cloroformo-metanol 5:5, cloroformo-metanol 4:6, cloroformo-metanol 3:7 y finalmente metanol.

Las fracciones obtenidas fueron sometidas a un evaporador rotatorio a baja temperatura (45 °C) y presión reducida (Yamato®, modelo BM 100) y agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico en capa fina.

## Actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión en disco para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto y las fracciones obtenidas a través de la columna cromatográfica (Tabla1).<sup>23</sup> Para ello se utilizó la cepa de *P. gingivalis* ATCC 53978, la cual fue ajustada al tubo 5 de la escala de McFarland en ( $15 \times 10^8$  UFC/mL), se tomaron 100  $\mu$ L de cada tubo con el crecimiento bacteriano y se depositó en cajas Petri con agar Mueller Hinton con 5% de sangre (BBL®), posteriormente se toman 10 $\mu$ L del extracto y las fracciones a probar, para impregnarse en papel filtro estéril de Whatman No.1 (Whatman® International LTD England). Se realizó por triplicado con las concentraciones 1000, 500 y 250  $\mu$ g/mL, utilizando como solvente dimetil sulfóxido (DMSO, marca CTR® Scientific) al 5% con agua bidestilada estéril; como controles se utilizaron agua bidestilada estéril con DMSO al 5% como control negativo y Clorhexidina al 0.12% (Consepsis-Ultradent®) como control positivo.<sup>24</sup> El procedimiento fue realizado dentro de una cámara de anaerobiosis marca Plas Labs® modelo 830-ABC, como una mezcla anaerobia compuesta por 10/13 cmol/mol bióxido de carbono, 20/13 cmol/mol hidrógeno y balance con nitrógeno, por Praxair®.<sup>25</sup> Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición expresado en mm.

## Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos.<sup>26</sup> Las concentraciones a evaluar fueron 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50  $\mu$ g/mL, también fueron incluidos muestras blanco con medio tiogliolato enriquecido con vitamina k y hemina (BD®), medio con inóculo y medio con controles antes mencionados. Nuevamente mediante cámara de anaerobiosis fue depositado el inóculo ajustado a la escala 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Los ensayos fueron realizados por triplicado. La placa fue incubada a 37°C durante 48 h. Después de este tiempo se midió la absorbancia OD600 mediante el espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus® marca Bio-Rad®. La menor absorbancia entre las concentraciones probadas, después de restar la

reconocida turbidez misma del extracto por su concentración evaluada se considera que es la concentración mínima inhibitoria (CMI).

#### Citotoxicidad mediante la técnica de rojo neutro con fibroblastos

La línea celular de fibroblastos humanos ATCC CRL-7222 Hs 274.T fue cultivada a una temperatura de 37 °C, en una incubadora de humedad controlada con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> (SHE L LAB® modelo TC2323).

Las células fueron cultivadas en el medio DMEM High Glucosa 1X (Gibco®) y se realizaron lavados con suero salino tamponado en fostatos (PBS, Gibco®); cada lavado fue realizado en una campana de flujo laminar clase II (marca LABCONCO®). Una vez obtenido el crecimiento adecuado se tomaron 5 x 10<sup>5</sup> células para cada prueba y fueron depositadas en placa de 24 pozos para leer su absorbancia a una longitud de onda de 560 nm utilizando un lector de placas marca Biorad® Modelo 550.

Se expusieron las sustancias a evaluar por 24 h, los controles fueron DMSO al 5% (CTR Scientific®) y Clorhexidina al 0.12% (Consepsis-Ultradent®) luego se agregaron 100 µL de rojo neutro, se elimina mediante lavado con PBS el colorante no incorporado y luego se midió la absorbancia nuevamente en el lector de placas.<sup>27</sup>

#### Mutagenicidad mediante la prueba de Ames

Se activó la cepa de referencia *Salmonella typhimurim* TA100 contenida en el Kit Muta-Chromo Plate® con el medio de crecimiento incluido en el sistema del kit; se incubó a 37°C por 18 h. Se disolvieron 100 mg de las fracciones y el extracto a evaluar con 0.5 mL de DMSO y agua destilada estéril hasta llegar a un volumen de 17.5 mL; posteriormente se filtraron por una membrana de 0.22 µm para su esterilización en frío. El mutágeno estándar contenido en el sistema fue el NaN<sub>3</sub> a una concentración de 0.5µg /100 µL. Se utilizaron placas de 96 pozos considerando una placa blanco (prueba de esterilidad), una placa como control negativo, una para control positivo donde se

utilizó azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), una placa para cada una de las fracciones con mayor actividad antibacteriana y otra para el extracto metanólico de *K. ramosissima*. Se contabilizaron los pozos positivos (con coloración amarilla) en las ocho placas evaluadas en los días 3, 4, 5, 6 y 7.<sup>28</sup>

#### Análisis espectroscópico

Se analizaron las fracciones con mayor actividad utilizando el equipo Nano UPLC- MS cuádrupolo TOF instrumento de Waters Mod. nanoAcquity® y MS Mod QTOF premier, Software MassLynx versión 4.1, los resultados obtenidos fueron comparados con los descritos para las especies de *Krameria* reportadas.<sup>17-20</sup>

#### Análisis estadístico

En la evaluación antimicrobiana de difusión en disco, los datos fueron expresados con media  $\pm$  desviación estándar (DE) de ensayos independientes con 3 repeticiones. Las comparaciones de las medias del efecto de inhibición de la concentración del extracto sobre *P. gingivalis* se hicieron mediante la prueba de *t-Student*, considerando el antiséptico de referencia la Clorhexidina al 0.12%. En los ensayos de inhibición de crecimiento se utilizó un modelo bivariado de regresión lineal para el extracto y la bacteria de estudio, considerando la dosis inhibitoria. Se utilizó el paquete estadístico Mega Stat® 2007, considerando como diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$ . Para la evaluación de mutagenicidad, se utilizó el software provisto por el fabricante, el cual consiste en un macro a través del programa Excel® donde emite una gráfica y dictamen a partir de la captura de los pozos positivos en los días de evaluación.

## Resultados y discusión

La planta utilizada en este estudio fue seleccionada por su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gingivales, asumiendo actividades antibacterianas. Los resultados obtenidos aportan evidencia que la bacteria *P. gingivalis* es sensible para el extracto metanólico de *K. ramosissima*, de manera similar los estudios reportados para molécula aislada dihidroxibenzofurano (DHBF) obtenida de *K. lappacea* por lo que se comprueba este solvente como adecuado para la extracción de sustancias con actividad antimicrobiana.<sup>29</sup>

Se obtuvo un rendimiento del extracto metanólico de raíz de *K. ramosissima* de 32%; en la evaluación de difusión en disco, los halos de inhibición obtenidos sobre *P. gingivalis* fueron significativos en relación con los controles observados ( $P < 0.05$ ). Las fracciones que resultaron con mayor inhibición fueron la 7 y 9, se detalla el sistema de extracción con el que se obtuvo cada fracción y los halos de inhibición obtenidos en la Tabla 1. En todas las fracciones se presentó actividad inhibitoria (inhibición  $> 8$  mm).<sup>23</sup> Al comparar las medias del efecto de inhibición con el control positivo empleando la prueba *t-Student* se obtuvo un resultado  $P < 0.05$ , lo cual se considera significativo.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) requerida para inhibir el crecimiento de *P. gingivalis* fue de 300  $\mu\text{g/mL}$  en las fracciones de mayor actividad. No se encontró crecimiento microbiano en las muestras control.

Las fracciones 7 y 9, fueron analizadas con métodos espectroscópicos, obteniendo de la fracción 7 un compuesto cuyo espectro MALDI-TOF MS muestra una señal del ion molecular  $m/z$  a 315  $[\text{M}+\text{H}]^+$  y el pico base a  $m/z$  163  $[\text{Glucosa} + \text{H}]^+$ , en estudios anteriores del género *Krameria*, se encontró en *K. cystisoides* entre otros neolignanós, el compuesto 5-(4-hidroxifenil-3-metoxifenil)-3,4-dimetil-tetrahidrofurano,<sup>18</sup> con peso molecular 314, en el presente estudio se localizó este compuesto solo que el pico base a  $m/z$  163 nos sugiere que está glicosilado por lo que se sugiere que su fórmula puede ser la presentada en la figura 1.

De la fracción 9 se obtuvo un compuesto cuyo pico en el espectro MALDI-TOF MS fue  $m/z$  297  $[M+H]^+$  por lo que su peso molecular es 296, en los estudios sobre neolignanos de Krameraceas, reportaron el neolignano de *K. tomentosa*<sup>17</sup>, 2-(2',4'-dihidroxifenil)-5-(E)-propenilbenzofurano) con estructura parecida a la obtenida en este trabajo y en *K. ramosissima*<sup>20</sup> se encontraron varios neolignanos entre ellos un compuesto con peso molecular 296 2-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil-5-propenilbenzofurano) que concuerda con el encontrado en este estudio y cuya fórmula podría ser la ilustrada en la figura 2.

La viabilidad celular de los fibroblastos mediante el método de rojo neutro dio los siguientes resultados: el extracto metanólico y las fracciones 7 y 9 a la dosis de 300  $\mu\text{g/mL}$  no mostraron daño celular según la lectura de la placa (Figura 3). En la prueba de Ames, los resultados de acuerdo a las lecturas de los días 3 al 7 mostraron que las fracciones 7, 9 y el extracto metanólico de *K. ramosissima* están por debajo del control positivo (Figura 4). La citotoxicidad de *K. ramosissima* fue reportada con línea de celular de hepatoma humano (Huh7) utilizando el extracto hidroalcohólico de la parte aérea de la planta; sin embargo en el caso del presente estudio se utilizó la raíz para la elaboración del extracto, y las células expuestas fueron fibroblastos humanos, en ambos casos el resultado no fue citotóxico frente a las células.<sup>30</sup> Es importante resaltar, que al igual que lo referido por diferentes estudios consultados la clorhexidina que fue la sustancia utilizada como control positivo antibacteriano, mostró daño celular sobre fibroblastos humanos, no así las fracciones y extracto analizado.<sup>31,32</sup>

El efecto mutagénico de *K. ramosissima* mediante la prueba de Ames no fue encontrado en la búsqueda bibliográfica como referente específico. Se reporta un trabajo de la evaluación de 20 plantas entre ellas *K. lappacea*, para la cual realizaron la prueba de mutagenicidad mediante el ensayo con *E. coli* WP2 encontrando que no hay actividad mutagénica.<sup>33</sup> En ambos casos, el resultado es que no es mutagénica.

## Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se considera que el extracto metanólico de *Krameria ramosissima* tiene actividad antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 53978), así como las fracciones 7 y 9, las cuales mostraron mayor actividad que el extracto. Estos datos infieren que es congruente el uso de esta planta que tiene la comunidad del norte de México para el manejo de la enfermedad periodontal. Los neolignanós presentes en las fracciones evaluadas, tienen por tanto participación dentro la actividad reportada, sin embargo aunque ya han sido reportados en esta y otras especies de *Krameria* se requieren más estudios para determinar su identificación completa. La información obtenida de los ensayos de citotoxicidad y mutagenicidad permiten configurar las sustancias evaluadas como seguras para la realización de mas estudios, colocándolas en ventaja sobre la clorhexidina, que ha presentado reportes de citotoxicidad y es actualmente la principal sustancia de uso local para el manejo de bacterias periodontopatógenas.

## Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada No.33819.

## Referencias

1. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plants. 2011. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>. Acceso 14 Junio 2013.
2. Wadud A, Prasad P, Rao M, Narayama A. Evolution of drug: a historical perspective. Bull Indian Inst Med Hyderebad. 2007; 37 (1): 69-80.

3. Efron D, Farber S M, Holmstedt B, Kline N L, Wilson R H L. Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs. Government Printing Office. Public Health Service Publications. No. 1645. 1970. (orig. 1967) Reimpresión, Washington, D.C. EUA.
4. Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. J Pharm Pharmacol. 2001; 53: 425-432.
5. Verde Star MJ. Estudio químico de *Krameria cytisoides*, *K.ramosissima*, *K. sonorae*, *K. grayi*, *Tiquilia canescens*, *Petalonyx crenatus* y *Kallstroemia maxima*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. División de Ciencias y Humanidades. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. 1987. México.
6. Simpson BB. The past and present use of rhatany (*Krameria*, Krameriaceae). Econ Bot. 1991; 3:397-409.
7. Simpson BB. Flora Neotropica. Krameriaceae. In: Organization for Flora Neotropica. New York Botanical Garden Press. 1989; 49: 1-108.
8. Jagan N, Subash KR, Sandeep K. Role of phytotherapy in gingivitis: A review. Int. J. Pharmacol. 2012; 8:1-5.
9. Di Pierro F, Catacchio V, Candidi C, Zerbinati N, Alfonso R. Rhatany-based preparation in vulvovaginitis and vaginosis. Arch Med Sci, 2009;168:339-346.
10. Clinton C. Plant tannins: A novel approach to the Treatment of ulcerative colitis. Nat. Med. J. 2009; 3:1-4.
11. Pil-ja S, Hong-Dae Ch-Wha Byeng H, Total Synthesis of Norneolignans from *Krameria* Species. Arch Pharm Res. 2004; 27: 1189-1193.
12. Medina M L, Medina M G, Merino L A. Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. Enf Inf Microbiol. 2010; 30: 83-90.

13. Liébana J, Castillo A M, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9:75-91.
14. Brodala N, Merricks E P, Bellinger D A, Damronsgri D, Offenbacher S, Beck J, Madianos P, Sotres D, *et al.* *Porphyromonas gingivalis* Bacteremia Induces Coronary and Aortic Atherosclerosis in Normocholesterolemic and Hypercholesterolemic Pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1446-1451.
15. Okuda K, Kimizuka R, Abe S, Kato T, Ishihara K. Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. *J Periodontol*. 2005; 6: 2154-2160.
16. Contreras A, Herrera J A, Soto J E, Arce R M, Jaramillo A, Botero J E. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. *J Periodontol*. 2006; 77: 182-188.
17. Madeiro S A, de Lucena, H, Siqueira A, Duarte M. C, Braz-Filho R, Barbosa-Filho M, da Silva M A, Tavares J. F. New Neolignans from *Krameria tomentosa* A. St.-Hil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2012; 23(11): 2021-2026.
18. Achenbach H, Grob J, Dominguez X A, Cano G, Star J V, Brussolo L C, Muñoz G, Salgado F. Lignans neolignans and norneolignans from *Krameria cystisoides*.; *Phytochemistry* 1987; 26: 1159-1166.
19. Baumgartner L , S Sosa , Atanasov AG , Bodensieck A , Fakhrudin N , J Bauer , Favero GD , Ponti C , Heiss EH , Schwaiger S , A Ladurner , Widowitz U , Loggia RD , Rollinger JM , Werz O , R Bauer , Dirsch VM , Tubaro A , Stuppner H . Lignan derivatives from *Krameria lappacea* roots inhibit acute inflammation in vivo and pro-inflammatory mediators in vitro. *J Nat Prod*. 2011; 74(8):1779-1786.
20. Achenbach H, Grob J, Dominguez X A, Verde-Star J, Salgado F. Ramosissin and other methoxylated nor-neolignans from *Krameria ramosissima*. *Phytochemistry*. 1987; 26 (7):2041-2043.

21. Díaz C, Heinzen H. Variaciones en el Perfil de Flavonoides y en la cantidad de Quercetina libre en Diferentes Extractos de *Achyrocline saturoides*. Acta Farm. Bonaer. 2006; 25 (4): 574
22. Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González MA, Rivera-Guillén MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst el Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44 (2):24-30.
23. Bauer A W, Kirby W M, Sherris JC, Tuck M. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method standard. Am J Clin Pathol. 1966; 45: 493 - 496.
24. Southern E N, McCombs G B, Tolle S L, Marinak K. Comparative Effects of 0.12% chlorhexidine and Herbal Rinse on Dental Plaque-Induced Gingivitis. J Dent Hyg. 2006; 80:1-9.
25. Hall G S. Anaerobic Bacteriology. En García L S: Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2007. 2° Edición. Ed. ASM Press. EUA.
26. Andrews J M. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimic Chemotherapy. 2001; 48: 5 -16.
27. Borenfreund E, Puerner J A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD / NR-90). J Tiss Cul Meth. 1984; 9: 7-9.
28. Ames B N, McCann J , Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 1975; 31:347-364.
29. Artini M, Papa R, Barbato G, Scoarughi GL, Cellini A, Morazzoni P, Bombardelli E, Selan L. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. Bioorg Med Chem. 2012;20(2):920-926.

30. Torres-González L, Muñoz-Espinosa L E, Rivas-Estilla A M, Trujillo-Murillo K, Salazar-Aranda R, Waksman N, Cordero-Pérez P. Protective effect of four Mexican plants against CCl<sub>4</sub>-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Ann Hepatol.* 2011; 10(1):73-79.
31. Torres-Capetillo E, Carrillo-Fuentevilla R, De la Garza-Ramos MA, Mercado Hernández R, Torre-Martínez HHH , Segoviano-Ramirez JC. Antimicrobial efficacy of neutral super-oxidized electrolyzed gel versus chlorhexidine digluconate 0.12% in biofilm formation on orthodontic miniimplants: An in vitro study. *J. Pharmacognosy Phytother.* 2013; 5: 64-71.
32. Gianelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of Chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro.* 2008; 22:308-317.
33. Vattuone M A, Jaime G S, Soberón, J R, Martinez-Arriazu M E, Sampietro D A., Sgariglia M A, Sgroi N, Selis A N, *et al.* Evaluación de especies vegetales como fuentes naturales de antimicrobianos y antioxidantes. Memorias de la XXI Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, Argentina. 2005 octubre 25 a 29. *Biocell*, 2006, 30(1): 163-230.

Tabla 1: Actividad *in vitro* del extracto metanólico y fracciones obtenidas de *Krameria ramosissima* contra *Porphyromonas gingivalis*

Compuestos	Diámetro de inhibición (mm)*		
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
Extracto metanólico	11.50±0.58	10.75±0.96	11.00±1.00
Fracción 1	5.88±1.08	9.67±0.61	9.45±0.51
Fracción 2	11.63±0.75	11.78±1.27	10.29±0.91
Fracción 3	10.68±1.04	10.55±0.68	10.66±0.78
Fracción 4	10.61±1.11	9.91±1.34	9.48±1.25
Fracción 5	12.88±0.85	10.83±1.04	11.18±0.95
Fracción 6	21.50±1.29	14.11±0.78	14.14±0.95
Fracción 7	22.00±1.41	19.70±1.52	20.41±0.65
Fracción 8	12.75±1.50	10.85±1.80	11.47±1.59
Fracción 9	18.38±1.38	16.64±1.31	17.15±1.00
Fracción 10	12.75±0.96	12.70±1.31	12.52±1.55
Fracción 11	12.08±0.83	13.00±1.41	13.67±0.58
Fracción 12	11.25±1.50	14.25±0.96	14.00±1.00
Fracción 13	17.65±0.47	17.75±0.50	17.67±0.58
Fracción 14	13.00±0.82	11.25±0.96	11.67±0.58
Control positivo (Clorhexidina 0.12%)	17.50±1.29	17.90±1.21	17.53±1.03
Control negativo (DMSO 5%)	7.81±1.29	5.25±0.30	5.15±0.20
*Valores expresados en promedio ± DE (Desviación estándar) (n=3)			

Sistemas utilizados por fracciones: Fracción 1= cloroformo, Fracción 2= cloroformo-metanol 9.5:1, Fracción 3= cloroformo-metanol 9.5:1 y cloroformo-metanol 8:2, Fracción 4= cloroformo-metanol 9.5:1, Fracción 5= cloroformo-metanol 8.5:1.5, Fracción 6= cloroformo-metanol 8:2, Fracción 7= cloroformo-metanol 7:3, Fracción 8= cloroformo-metanol 7:3 y cloroformo-metanol 6:4, Fracción 9= cloroformo-metanol 6:4, Fracción 10= cloroformo-metanol 1:1, Fracción 11= cloroformo-metanol 4:6, Fracción 12= cloroformo-metanol 4:6, Fracción 13= cloroformo-metanol 3:7, Fracción 14= metanol.

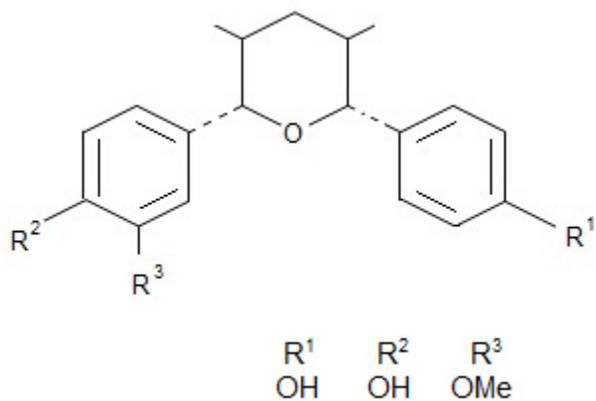


Figura 1: Fórmula asociada al compuesto 5-(4-hidroxifenil-3-metoxifenil)-3,4-dimetiltetrahidrofurano (glicosilado) presente en la Fracción 7 (del extracto metanólico de *K. ramosissima*).

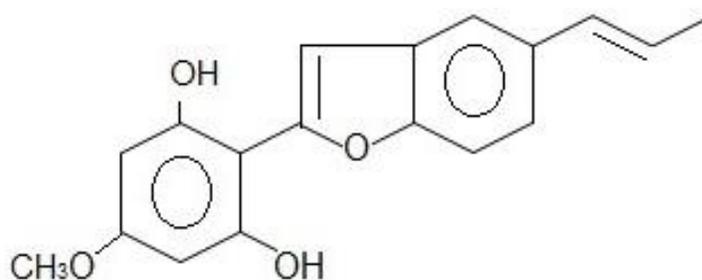


Figura 2: Fórmula asociada al compuesto 2-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil)-5-propenilbenzofurano presente en la Fracción 9 del extracto metanólico de *K. ramosissima*.

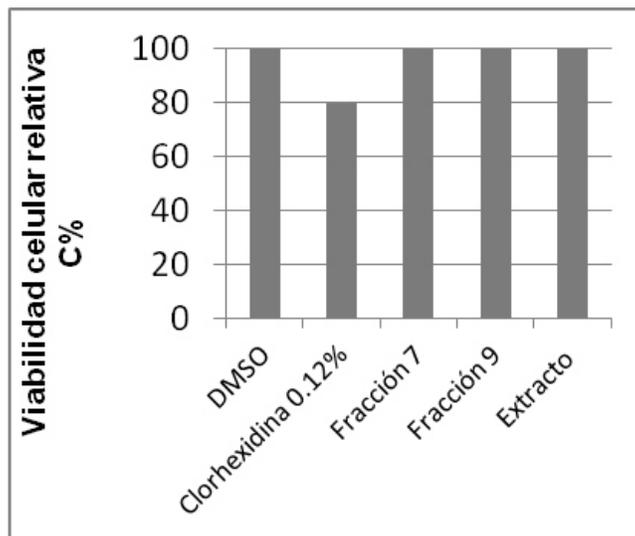


Figura 3. Viabilidad celular en fibroblastos mediante la exposición del extracto y fracciones de *Krameria ramosissima*

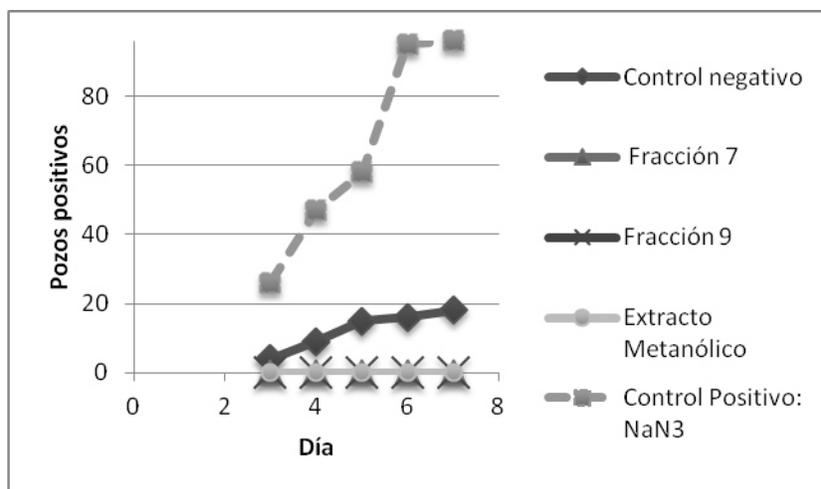


Figura 4: Mutagenicidad para el extracto metanólico y fracciones de *Krameria ramosissima*