

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



“Evaluación Antimicrobiana *in vitro* de los Extractos de Hexano,  
Acetato de Etilo, Metanol y Acuoso de *Croton hypoleucus*, y  
Metanol de *Leucophyllum frutescens*”

Tesis para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta

**DIEGO VARGAS MENDOZA**

Director de Tesis

**DR. JUAN ANTONIO GAYOSSO DE LUCIO**

Codirección

**DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE**

**MTRA. MA. DE LOURDES MÁRQUEZ CORONA**



San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 27 de febrero de 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

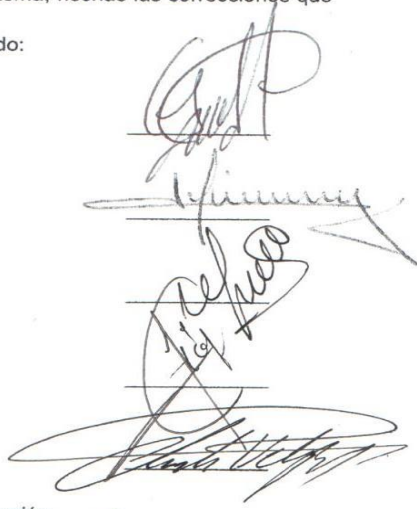
Of. No MCBS/2013/118  
 Asunto: Asignación de Jurado de examen

CD Diego Vargas Mendoza  
 Candidato a Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada “Evaluación Antimicrobiana in vitro de los Extractos de Hexano, Acetato de etilo, Metanol y Acuoso de Croton hypoleucus y Metanol de Leucophyllum frutescens.” con el cual obtendrá el **Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud** y que después de revisarla han decidido autorizar la impresión de la misma, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DR. JUAN ANTONIO GAYOSSO DE LUCIO
- PRIMER VOCAL DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE
- SECRETARIO MTRA. MARÍA DE LOURDES MÁRQUEZ CORONA
- SUPLENTE DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
- SUPLENTE DRA. CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ



Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
 San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 30 de octubre de 2013

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL  
 DIRECTOR



M.C. ESP. MARICELA GUEVARA CABRERA  
 COORDINADORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ICSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Durante el desarrollo de esta investigación, se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número 412657.

Durante el periodo Marzo-Mayo de 2013 se realizó una estancia nacional de investigación en el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM en Ciudad Universitaria, apoyada por Beca Mixta CONACyT.

Parte de este trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, 29-31 Mayo 2013  
“Evaluación de los extractos de Hexano, Acetato de etilo metanol y Acuoso *in vitro* de *Croton hypoleucus* frente a patógenos bucales” Pachuca de Soto, Hidalgo. UAEH.

Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, 29-31 Mayo 2013  
“Composición Química del extracto de Metanol de *C. hypoleucus*”.

X Encuentro de la Mujer en la Ciencia, 15-17 Mayo 2013 “Evaluación antimicrobiana *in vitro* de los extractos de Hexano, Acetato de etilo Metanol de *C. hypoleucus* y Metanol de *L. frutescens*” Centro de investigaciones en Óptica A.C. León, Guanajuato.

## **Agradecimientos**

La realización de un trabajo de tesis hasta hace 2 años o un poco mas, no se encontraba planeada en mi futuro, pero la realización de la misma me llevo a conocer un mundo nuevo de personas y conocimiento lo cual ha sido un viaje maravilloso como difícil, el cual me motivo para continuar por este camino, teniendo la responsabilidad y oportunidad de devolver a mi entorno lo poco o mucho que he aprendido; la responsabilidad de un maestro siempre es saber, ser y hacer.

A mi padres por darme siempre el consejo necesario en el momento adecuado y siempre apoyarme en todo momento, tanto a mi madre que siempre esta al pendiente de mi y sus consejos atinados y nobleza de corazón, como a mi padre que aunque ya no esta conmigo, es parte de este trabajo del cual llevo siempre conmigo en mi corazón sus ejemplos y enseñanzas. A mi hermana Adriana quien ha sido mi ejemplo a seguir, siempre alentándome y ayudándome para que continuara estudiando; a mi hermano por demostrarme que siempre se puede seguir adelante y alcanzar sus sueños en cualquier momento.

A Juan Antonio que compartió su conocimiento y enseñanzas conmigo además de su paciencia y apoyo durante estos dos años, pero sobre todo por tu amistad.

A Laurie por su apoyo, enseñanzas y platicas maravillosas lo cual hace de cualquier momento de trabajo una experiencia única y nutritiva; por tu amistad.

A Lulú por darme apoyo y confianza, además de motivarme a que continúe siempre superándome.

A Claudia por sus consejos y tiempo que me dedico, el cual fue vital para este trabajo.

A Eliezer por su amistad y apoyo durante estos dos años.

A Paty por sus incontables consejos en todo este tiempo, por tu amistad y enseñanzas, e incontables momentos agradables que pasamos, eres de las personas con las que mas conviví durante este proceso.

A Mary por todas las charlas y mañanas de desayuno en el laboratorio y por su amistad.

A Carlos por sus consejos y amistad en estos dos años, hiciste de esta experiencia un camino más fácil.

A Rodolfo por brindarme su amistad apoyo y consejos, además de sus ejemplos y verme como un amigo y un hijo. A Carmen por su amistad y apoyo.

A mis amigos por su paciencia y entender que a veces no podía verlos por situaciones de trabajo.

A mi Universidad por brindarme la oportunidad de realizar un sueño mas. A la UNAM por abrirme sus puertas y permitirme realizar parte de mi investigación allá. A todos los que formaron parte de este trabajo.

A las personas que me dedicaron un día entero y se la amanecieron conmigo en la elaboración de esta tesis, fue mi primer amanecer con ustedes.

A CONACyT por financiar parte del proyecto.

Espero que la sencillez de este trabajo aporte algo al campo de la investigación y sirva a alguien que incursione como lo hice yo, en temas afines a este.



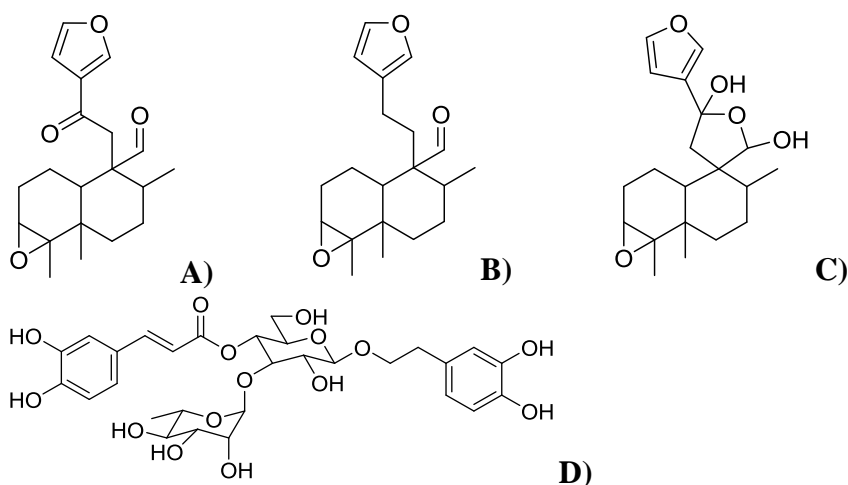
## Tabla de Contenido

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
2.1. Antecedentes.....	2
2.1.1. Factores microbiológicos asociados con las enfermedades periodontales .....	4
2.1.2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana .....	6
2.1.2.1. Resistencia natural y adquirida .....	6
2.1.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....	7
2.1.3.1. Métodos de dilución en caldo y agar .....	9
2.1.4. Metabolismo de las plantas.....	11
2.1.5. Métodos para la extracción de metabolitos .....	13
2.1.5.1. Extracción con disolventes.....	13
2.1.5.2. Extracción discontinua o simultánea .....	15
2.1.6. Plantas medicinales en la odontología .....	15
2.1.6.1. Familia Euphorbiaceae .....	16
2.1.6.2. Género Croton.....	17
2.1.6.3. Croton hypoleucus.....	17
2.1.6.4. Usos medicinales del género Croton.....	18
2.1.6.5. Género Croton en enfermedades bucales .....	22
2.1.6.6. Leucophyllum frutescens .....	22
2.2. Justificación .....	24
2.3. Hipótesis .....	25
2.4. Objetivos.....	25
2.4.1. Objetivo general.....	25
2.4.2. Objetivos específicos.....	25
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. Fitoquímica .....	26
3.1.1. Colecta de material vegetal .....	26
3.1.2. Obtención de extractos.....	26
3.1.3. Disolución de los extractos .....	30
3.1.4. Caracterización e identificación de compuestos mayoritarios .....	30
3.1.4.1. Fracción D .....	33
3.1.4.2. Fracción F: labdano 1 .....	34
3.1.4.3. Fracción F: labdano 3 .....	36
3.1.4.4. Extracto de metanol de Leucophyllum frutescens .....	36
3.2. Microbiología (determinación de actividad antibacteriana) .....	38
3.2.1. Especies bacterianas evaluadas.....	38
3.2.2. Condiciones de cultivo .....	38
3.2.3. Determinación de concentraciones óptimas de estudio.....	39
3.2.4. Evaluación de extractos crudos .....	42
3.2.5. Evaluación de compuestos puros .....	43
3.3. Análisis estadístico de datos .....	45

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
4.1. Fitoquímica .....	46
4.1.1. <i>Caracterización e identificación de compuestos mayoritarios</i> .....	46
4.1.1.1. <i>Fracción D</i> .....	48
4.1.1.2. <i>Fracción F: labdano 1</i> .....	50
4.1.1.3. <i>Fracción F: labdano 3</i> .....	53
4.1.1.4. <i>Extracto de metanol de Leucophyllum frutescens</i> .....	55
4.2. Microbiología (determinación de actividad antibacteriana) .....	57
4.2.1. <i>Evaluación de extractos crudos</i> .....	57
4.2.2. <i>Resultados estadísticos de los extractos crudos</i> .....	63
4.2.3. <i>Evaluación de compuestos puros</i> .....	69
4.2.4. <i>Resultados estadísticos compuestos aislados</i> .....	71
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>75</b>
5.1. Conclusiones .....	76
5.2. Perspectivas .....	77
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>84</b>
7.1. Índice de figuras .....	84
7.2. Índice de tablas .....	86
7.3. Listado de abreviaturas .....	87

## 1. RESUMEN

En este trabajo de investigación se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos (hoja y tallo) acuoso, acetato de etilo, hexano y metanol de *Croton hypoleucus*, y el extracto de metanol de *Leucophyllum frutescens*, contra bacterias colonizadoras de la cavidad bucal, relacionadas a enfermedad periodontal; cabe destacar que es el primer estudio que se realiza de *C. hypoleucus*. Las bacterias fueron evaluadas por método de microdilución en caldo y se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI). Todos los extractos de *C. hypoleucus* presentaron inhibición bacteriana, a excepción del extracto acuoso; el extracto de hexano fue el más bioactivo, inhibiendo el 70% de las bacterias evaluadas, tuvo una CMI contra *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* de 512 µg/ml; seguido por el extracto de metanol de *L. frutescens*, el cual inhibió 20% de las bacterias y mostró una CMI de 512 µg/ml contra la misma bacteria. El estudio biodirigido del extracto de hexano de *C. hypoleucus* condujo al aislamiento de tres labdanos (A-C), siendo el mayoritario el labdano asignado como 1, con un rendimiento del 8%; se llevó a cabo la evaluación antimicrobiana de los compuestos mayoritarios 1 y 3. Para el labdano 1 la CMI fue de 16 µg/ml contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. a; en el extracto de metanol de *L. frutescens*, el compuesto mayoritario fue el acteosido (D), con un 30% de rendimiento en el extracto, siendo el responsable del efecto, con una CMI de 64 µg/ml contra *A. actinomycetemcomitans* stp. a.



Estructura química de: **A)** labdano 1, **B)** labdano 2, **C)** labdano 3, **D)** acteosido.



## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Antecedentes**

A lo largo de la historia, las plantas han provisto al hombre de un sinnúmero de moléculas con efectos terapéuticos; los productos derivados de plantas han dominado la farmacopea a través de la historia y ayudado en el proceso de enfermedad en el hombre. A finales del siglo XIX fue obtenido el primer fármaco sintético por F. Bayer y F. Hoffman, el cual es llamado comúnmente aspirina (ácido acetil salicílico); un compuesto activo utilizado como analgésico. Esto marcó un punto de inflexión entre la industria farmacéutica y la investigación de nuevas moléculas procedentes de productos naturales. Posteriormente ganó terreno la industria farmacéutica, debido a la síntesis guiada de nuevos compuestos orgánicos y el diseño computacional de nuevos fármacos; Por este motivo, se redujo el número de moléculas aisladas a partir de productos naturales, lo cual declinó principalmente en los años 1984-2003, donde el número de moléculas aisladas a partir de productos naturales de un total de 847 en ese periodo, fue de 43 moléculas de origen natural y derivadas de productos naturales fueron 232; 572 fueron sintéticas. La naturaleza provee de un vasto número de moléculas, debido a la diversidad en familias, géneros y especies (1).

México cuenta con una riqueza histórica en el uso de plantas con uso terapéutico frente a diversas enfermedades, por una parte como consecuencia a la riqueza en flora, lo que es factor principal para el desarrollo, utilización e investigación de plantas medicinales (2-4); en esta área, hay reportes que indican que se usan entre 3000 a 5000 especies de diferentes familias, como remedio a distintas enfermedades (2, 3); esto ha hecho que se utilicen estos recursos en países con economía en desarrollo (OMS), así como el estudio de nuevas especies, con el objeto de disminuir costos y aumentar las posibilidades de éxito en el tratamiento de las enfermedades (2, 5).

La medicina alopática ha sido la de mayor crecimiento y aplicación, considerándose como todo aquel tratamiento que no es alternativo u homeópata, basado en un método científico. Por otra parte el uso de la fitoterapia es aquella que utiliza todo material de origen vegetal con utilidad o finalidad terapéutica (6).

El uso de la fitoterapia es extensa, entre las principales aplicaciones se encuentran: analgésico (7), antiinflamatorio (8), antimicrobiano (9, 10), anticancerígeno y cardiotónico por mencionar algunos (11). El uso de plantas medicinales en enfermedades bucales es una actividad cotidiana (12), algunas especies que se usan son: el *Syzygium aromaticum* (Clavo), *Mentha piperita* (13), *Croton* (palo blanco) (3) entre otros. La enfermedad periodontal, es el segundo padecimiento bucal más frecuente a nivel mundial y nacional, su principal factor etiológico es de origen bacteriano y por ende estados inflamatorios, por lo tanto es común, encontrar en la farmacopea el uso de plantas con actividad terapéutica, donde se busca sea efectiva y con menos efectos adversos.

*Croton* pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, la cual se encuentra distribuida alrededor de todo el mundo, tiene más de 800 (14) especies. El género *Croton*, ha sido ampliamente estudiado como anticancerígeno, analgésico y antimicrobiano en diversas enfermedades, entre estas, las bucales (8, 15-17).

*Croton hypoleucus* es una (14) especie endémica de México la cual no cuenta con estudios previos, siendo este el primer estudio fitoquímico y farmacológico, así como la evaluación de su efecto antimicrobiano en 10 cepas colonizadoras de la cavidad bucal y que juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal junto con la caries, son los padecimientos con mayor incidencia en la consulta dental según la OMS (organización mundial de la salud) causando afectaciones a nivel sistémico (18, 19), emocional y psicológico (20) además de pérdidas económicas (21). Definiéndose a la enfermedad periodontal como una patología destructiva del periodonto, caracterizada por la presencia de infección y cuya consecuencia es una reacción inflamatoria (gingivitis) (22) por parte del hospedero a la flora microbiana y sus productos, y donde puede presentar en su segunda fase (periodontitis), la pérdida de los tejidos de soporte del diente (22, 23).

Es de vital importancia mencionar que en esta enfermedad su principal factor etiológico es microbiano (24), aunque factores genéticos, culturales, antecedentes patológicos y no patológicos representan riesgo (25, 26), así como predisposición a presentar enfermedad periodontal.

### 2.1.1. Factores microbiológicos asociados con las enfermedades periodontales

La presencia de ciertas bacterias, así como su proporción, en la enfermedad periodontal, juegan un rol importante; el Doctor Socransky postuló un esquema de sucesión microbiana, seguido de una interacción recíproca huésped-bacteria. Clasificó a las bacterias de acuerdo al orden en la colonización y patogenicidad, agrupándolas en complejos con un color específico (figura 1). Como primer grupo colonizador se tiene al complejo amarillo, verde y morado, junto con grupos de *Actinomyces* (25). Esto permite una sucesión autogénica, además de la llegada del complejo naranja considerados patógenos putativos o colonizadores puente, por último el complejo rojo o patógenos reconocidos; la presencia y el aumento de los niveles en cantidad de los dos últimos complejos, determina de manera importante la presencia de la gingivitis y por ende enfermedad periodontal.

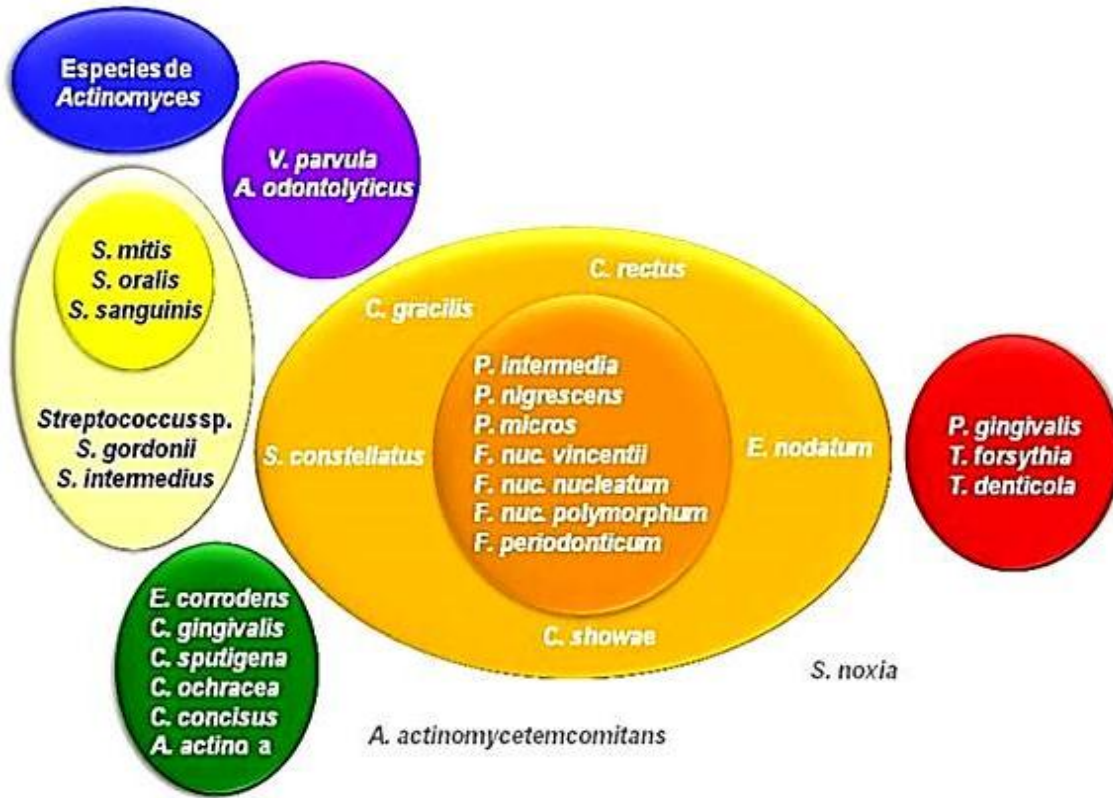
La presencia del cuadro clínico de la gingivitis permite la colonización no solo de los complejos naranja y rojo sino de los colonizadores primarios o complejos verde, amarillo y morado, permitiendo la continuidad del ciclo, el cual puede ser roto mediante diferentes vías (25, 27):

- La eliminación total de la placa.
- La eliminación de los complejos rojo y naranja.
- Enfoques antimicrobianos, disminuyendo al complejo rojo y naranja.

El complejo morado se compone por *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula*; el complejo verde está compuesto por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*; además dentro del grupo de los *Actinomyces* tenemos a: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* 1 y 2, *Actinomyces gerencseriae*, formando a los colonizadores primarios; el complejo amarillo se compone por *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Dentro de los colonizadores puente o complejo naranja (también llamados putativos) tenemos a: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium*

*periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*. El complejo rojo o colonizadores tardíos (patógenos reconocidos) son: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* (24, 25, 27).



**Figura 1.** Complejos bacterianos en la placa subgingival relacionados con las enfermedades periodontales. (Tomado de Socransky, *et al.* (25)).

Estas bacterias son anaerobias estrictas y facultativas, Gram negativos y Gram positivas tienen un importante papel en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis (28).

En un estudio descriptivo entre la microbiota supragingival frente a la subgingival en población mexicana con periodontitis crónica y población sana periodontal, hecho por la Doctora Ximénez-Fyvie, de 40 especies bacterianas, se comprobó la presencia de las 40 en ambos ambientes supra como subgingival (24, 29). Las muestras supragingivales mostraron altos conteos de *A. naeslundii*, *A. israelii*, *A. odontolyticus*, *N. mucosa*, *S. gordonii*, *C. ochracea* y *C. sputigena* (complejo morado y verde); a comparación de los conteos de la placa subgingival en donde se presentó una cantidad significativa de: *T. forsythia* y *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, microorganismos que pertenecen a el complejo rojo, esto en pacientes con enfermedad periodontal; mientras que la biopelícula supragingival dio altos

conteos del complejo verde, amarillo y morado así como de especies de *Actinomyces*. Arrojando datos, acerca de la composición de la placa supragingival, la cual puede albergar patógenos periodontales putativos, con un posible rol en el microambiente como reservorio para una infección subgingival o sitio de distribución de distintas especies, además, la alteración en cantidad de microorganismos respecto a pacientes sanos y enfermos periodontales marca la diferencia (29).

Una manera de prevenir y tratar esta enfermedad, es disminuyendo la proporción bacteriana, utilizando un auxiliar de limpieza como son enjuagues bucales, los cuales contengan antimicrobianos eficaces contra estos complejos bacterianos, principalmente patógenos reconocidos (complejo rojo) y patógenos putativos (complejo naranja) y los cuales sean inocuos para las estructuras bucales y sin efectos adversos. Los fármacos más utilizados en enjuagues bucales, son la clorhexidina, la cual ocasiona pigmentación dental y atrofia de papilas gustativas; las bacterias poseen una diversidad de mecanismos de resistencia con el fin de sobrevivir a medios hostiles y agresiones de su entorno.

### ***2.1.2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana***

La búsqueda de nuevas moléculas, principalmente con efecto antimicrobiano, se debe al aumento de la resistencia bacteriana y alta incidencia de las enfermedades. Los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos de distintas maneras: 1) la bacteria produce enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes de que este alcance su blanco o lo modifica de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco. 2) la pared celular se vuelve impermeable al agente antimicrobiano. 3) el blanco es alterado por mutación de tal forma que no permite la unión del agente antimicrobiano. 4) La bacteria posee una bomba de eflujo, la cual expulsa el antimicrobiano antes de que este alcance su blanco. 5) se alteran las rutas metabólicas para que en determinado caso el antimicrobiano no pueda causar algún efecto (30).

#### ***2.1.2.1. Resistencia natural y adquirida***

En algunos casos la resistencia bacteriana es una propiedad intrínseca o innata. Esta resistencia se debe generalmente a los mecanismos anteriormente descritos. Como podría ser que el antimicrobiano sea demasiado grande como para entrar en la célula a través de las porinas de su membrana externa. Las bacterias pueden además adquirir resistencia a los

antimicrobianos mediante mutación, conjugación, transformación, transducción y transposición (30).

**Mutación:** La resistencia microbiana por mutación se da del resultado de la mutación espontánea en un locus, el cual controla la susceptibilidad al antimicrobiano. La mutación ocurre con una frecuencia baja, pero cuando la bacteria es expuesta a un antimicrobiano, solo sobreviven las bacterias resistentes, estas se multiplican y dan como resultado a una población resistente. Las mutaciones también pueden ocurrir en plásmidos (material genético extracelular el cual puede contener genes resistente, ejemplo beta-lactamasas).

**Conjugación:** las bacterias con frecuencia contienen material genético extracromosómico llamado plásmido, los cuales llevan material genético resistente. Cuando dos células bacterianas se encuentran cerca, por medio de una estructura llamada pilis, se unen entre estas permitiendo así el intercambio entre plásmidos de la resistencia bacteriana.

**Transformación:** las bacterias pueden encontrar fragmentos de DNA los cuales contienen el gen resistente, estos genes son incluidos dentro de la célula por un mecanismo llamado transformación. El DNA es recombinado con el material genético de la bacteria por recombinación dando la resistencia como resultado.

**Transducción:** Este proceso se lleva a cabo mediante los bacteriófagos (virus bacterianos) los cuales encuentran en el interior el citoplasma fragmentos de DNA, estos podrían empacarse en la capsula viral la cual al entrar a otra célula huésped, puede traspasar la resistencia a la célula huésped.

**Transposición:** los transposones son secuencias genéticas móviles con capacidad de moverse de un área del cromosoma a otra o entre plásmido-cromosoma o DNA de bacteriófagos (30).

### **2.1.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

Es de vital importancia la realización de pruebas antimicrobianas dentro del ámbito clínico como de investigación, debido al aumento de resistencia de cepas bacterianas, ya sea por una incorrecta posología, automedicación, misma naturaleza bacteriana, contaminación intrahospitalaria (31) o con fines de investigación. Además de la investigación de nuevas moléculas de origen natural con mejores efectos (32).

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA) han cobrado mayor relevancia por el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos existentes y evaluar nuevas fármacos (33).

La finalidad primordial de una PSA es la de predecir cómo se comportara cierta cepa bacteriana al estar en contacto frente a un fármaco o droga en un paciente; desde este punto de vista, un resultado de sensible significaría que es altamente probable que la bacteria sea eliminada y que el paciente responda positivamente al tratamiento administrado (34). A diferencia de un resultado como resistente en donde nos indicaría que el tratamiento para el proceso infeccioso con la sustancia activa en específico fallara y que la bacteria no será eliminada por dicha sustancia (35).

Se debe aclarar que en las pruebas de sensibilidad solo se intenta predecir o hacer inferencia a partir de estudios *in vitro* (35) de la inhibición bacteriana que se daría en organismos vivos, hay múltiples factores que *in vivo* pueden modificar nuestro resultado, como es el caso de la enfermedad periodontal, la cual por medio de la formación de una “biopelícula”, aloja y protege las bacterias en cuestión, en la cual las pruebas de sensibilidad no nos puede asegurar que se obtendrá el mismo resultado.

Dentro de las PSA tenemos una variedad de pruebas para comprobar si algún microorganismo es susceptible a algún fármaco, teniendo principalmente dos grandes grupos: cualitativas y cuantitativas (36).

Las PSA son indicadas donde no se pueda comprobar la susceptibilidad por medio de los antibiogramas existentes, lo que ha aumentado en los últimos años, (37) dando como resultado una débil predicción para algunas especies. Estas pruebas están indicadas con propósitos de vigilancia y estudios clínicos como de investigación.

**Cualitativas:** Principalmente en esta categoría la función de la prueba es reportar si es Sensible, Intermedio o Resistente al fármaco, sin reportar en función a cantidad la inhibición o letalidad bacteriana. La prueba más comúnmente usada como prueba cualitativa es el método de Kirby-Bauer (30) (método de difusión por disco o antibiograma).

**Cuantitativas:** Dentro de este grupo se reporta junto con la CMI concentración mínima inhibitoria, la capacidad del fármaco para inhibir el crecimiento bacteriano a la menor concentración de la droga (38) o incluso si tiene un efecto bactericida o bacteriostático,

además de cuantificar el grado de inhibición. Dentro de esta categoría tenemos el método de *dilución en caldo, dilución en agar y prueba de E-test*.

### **2.1.3.1. Métodos de dilución en caldo y agar**

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se utilizan para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones. Enseguida se inocula cada uno de los tubos (pocillos) o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de 24, 48 o 72 horas dependiendo de la curva de crecimiento del microorganismo de estudio, y se determina la CMI del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. Por esto para obtener resultados reproducibles cada detalle debe ser cuidadosamente controlado (39).

Para realizar pruebas de sensibilidad e identificación, se debe partir de un cultivo primario en medio sólido y se debe procesar una colonia aislada de cada tipo de microorganismo; es decir no se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre cultivos mixtos, ni sobre material clínico sin procesar, siempre realizarse sobre cultivos puros (30).

El valor de CMI obtenido por el método de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CMI, sin embargo, no representa un valor absoluto. La CMI real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si por ejemplo, fueran probadas diluciones al medio y se determina una CMI de 16 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/ml. Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de  $\pm 1$  dilución (40).

El método de dilución en caldo como ya se mencionó, nos arroja resultados de manera cuantitativa de la concentración necesaria para inhibir el desarrollo de un organismo dado (30, 40). En la prueba de microdilución en caldo, actualmente la más utilizada para obtener la CMI, se realiza en una placa de poliestireno que contiene, en la forma estándar más utilizada 96 pocillos. Donde en una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes



antimicrobianos. En la mayoría de los sistemas se colocan 100 µl en cada pozo aunque este puede variar, y teniendo una capacidad máxima de 350 µl cada pocillo en el formato de 96 pozos, el cual jamás deberá ser utilizado a su máxima capacidad. El caldo Müller-Hinton es el más recomendado para el crecimiento y pruebas de susceptibilidad para microorganismos aerobios o facultativos de rápido crecimiento, aunque esto depende de la bacteria a crecer. Este caldo debe estar correctamente balanceado con un contenido apropiado de Cationes suministrados por el fabricante ( $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ). Cada lote debe ser analizado con un medidor de pH después de que el medio se haya preparado. El pH correcto es entre 7.2 y 7.4 a una temperatura de 25°C.

En el método de dilución en tubo, se utilizan una serie de tubos que contienen un medio de cultivo estéril el cual sostendrá con vida a los microorganismos y varias concentraciones de cada uno de los antibióticos que se van a ensayar. Todos los tubos se inoculan con el microorganismo que va a ser ensayado y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Los agentes antimicrobianos se preparan en soluciones madre concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener la concentración deseada.

Un tubo con caldo se deja sin inocular como control negativo de crecimiento, a su vez otro tubo sin la sustancia activa para observar el máximo crecimiento como control positivo. Posteriormente se examinan los tubos para determinar en cuáles de ellos se ha inhibido el crecimiento del microorganismo. El microorganismo crecerá en el tubo control positivo y en todos los otros que no contengan la cantidad suficiente de sustancia activa para inhibir su desarrollo. El pocillo o tubo que presente ausencia de crecimiento igualando al control negativo, se designara ésta concentración como concentración mínima inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja capaz de prevenir el crecimiento del microorganismo. Aquellos antibióticos que tengan la CMI más baja deberán ser los que tengan la mayor actividad antimicrobiana frente al patógeno.

Para medir la capacidad de la sustancia activa capaz de evitar la proliferación de un microorganismo, se hace mediante la obtención de la (CMB) Concentración mínima Bactericida, se debe realizar con el mismo sistema de dilución en caldo para medirla. Al mismo tiempo que la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo control de crecimiento, inmediatamente después de ser

sembrado en los tubos, también debe ser sembrado en una placa de agar, para determinar la unidades formadoras de colonia o UFC del inóculo.

Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la incubación de la placa de agar, el tiempo depende de la curva de crecimiento del microorganismo y por multiplicación del factor de dilución. Una vez determinada la CMI, se siembra una cantidad conocida del inóculo de cada una de los tubos o pocillos que no presentaron turbidez en placas de agar, y el número de colonias que crecen en los sub-cultivos, después de la incubación, se compara con el número de UFC del cultivo original. Dado que algunas sustancias activas que son bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración de la sustancia activa que permite sobrevivir a menos del 0.1% del inóculo original se denomina concentración mínima bactericida (CMB) o concentración mínima letal (CML).

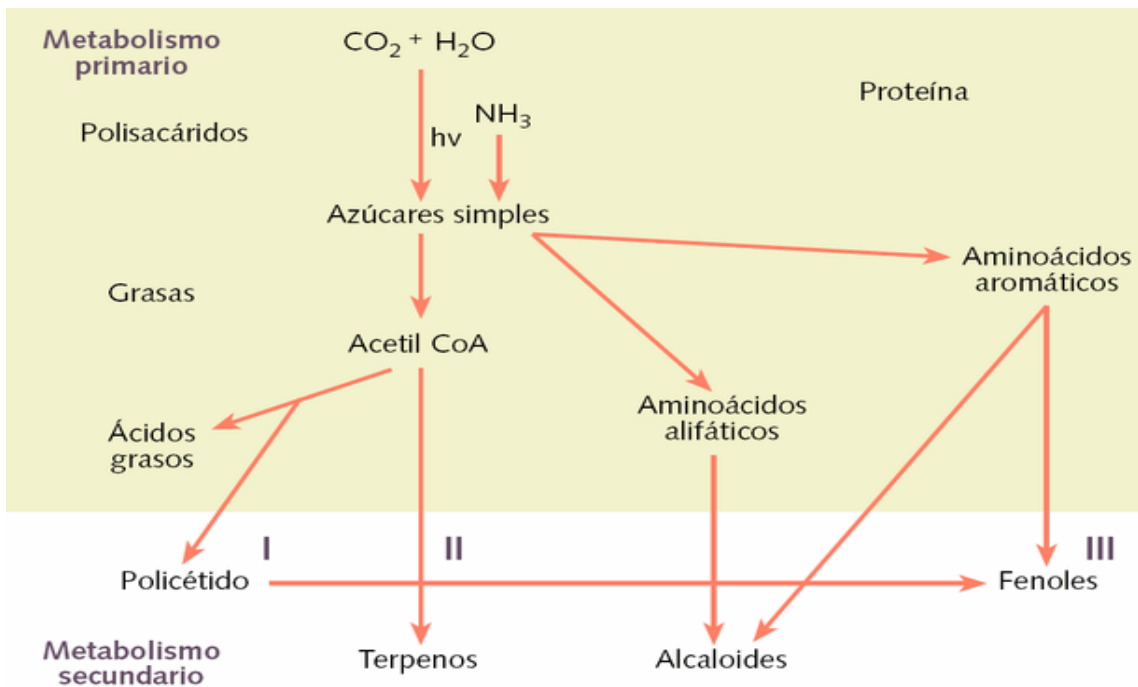
#### ***2.1.4. Metabolismo de las plantas***

Se define al metabolismo como, al conjunto de reacciones físico-bioquímicas que tienen lugar en un organismo (célula) y de las cuales depende la vida, funcionamiento y mantenimiento de este. En las plantas, la mayor parte del carbono y nitrógeno es llevado a moléculas ubicadas en la células del organismo que las utilizará; obteniendo a través de reacciones químicas, aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos denominados *metabolitos primarios*; los cuales se encuentran en todas las plantas desempeñando funciones establecidas (41).

Pero además las plantas destinan una importante cantidad de carbono asimilado y de energía a la síntesis de una gran variedad de metabolitos, de los cuales parecen no tener desempeño directo en las funciones básicas de la planta, a los cuales se le ha mal-llamado *metabolitos secundarios* (41, 42).

Los metabolitos secundarios o también llamados productos naturales o productos secundarios, además de no tener una función definida, reúnen ciertas características a diferencia de los metabolitos primarios (43); una de estas es la distribución, esto significa que los metabolitos secundarios se encuentran restringidos a ciertos géneros o incluso especies, estos metabolitos característicos y de baja distribución o localización; a diferencia de los

primarios, los cuales se encuentran en la mayoría de las familias. Cabe mencionar que se sintetizan en bajas cantidades, siendo restringida aún más su localización (42).



**Figura 2.** Metabolismo primario y secundario del ciclo de carbono en plantas.

En la figura 2 podemos observar como a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  principalmente, a través de reacciones bioquímicas se biosintetizan los metabolitos secundarios, mediante las vías de la acetil coenzima A, ácido mevalónico y ácido síkimico (43, 44).

Un ejemplo es el metabolito llamado salicina, el cual es un metabolito secundario de los más estudiados en cuanto a su distribución natural y función; el cual se encuentra en las estructuras reproductivas y hojas de 34 especies hasta el momento estudiadas, lo que confirma en este caso una distribución amplia; este metabolito induce a la floración, participa en la regulación del potencial de las membranas celulares y la resistencia a enfermedades (45), induce cambios de temperatura en plantas termogénicas, interviene en la expresión de ciertos genes y actúa como atrayente de parásitos de los Sauces.

Los metabolitos primarios como el ácido shiquímico y el acetato proveen de materia esencial para la sintetizar los metabolitos secundarios. El ácido shiquímico por su ruta metabólica da origen a mucho productos aromáticos y fenólicos, entre ellos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas. El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato, y los terpenos o isoprenoides son

sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato. Los aminoácidos son los precursores de los alcaloides y de los antibióticos peptídicos (42-44).

Dentro de las funciones que se piensa podrían tener los metabolitos secundarios y las cuales no están bien definidas se encuentran las siguientes: funciones: ecológicas como atrayentes o repelentes de animales; pigmentos o colorantes a las flores o frutos, proporcionando atracción a ciertos insectos o aves y así llevar a cabo la polinización, o atracción de animales con objeto de diseminar la semilla por vía de la heces. Otros compuestos tienen la función de protección frente a depredadores, actuando como repelentes, dando un sabor amargo o incluso indigestantes. También función defensiva frente a patógenos u hongos (41).

Como se mencionó anteriormente también son llamados productos naturales y tienen un gran uso medicinal y económico, ya que son ampliamente utilizados en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica.

Los metabolitos secundarios pueden agruparse en cuatro grandes grupos (44):

- **Terpenos:** Aceites esenciales, hormonas o pigmentos.
- **Compuestos fenólicos:** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- **Glicósidos:** saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos, y glucosinolatos.
- **Alcaloides:** núcleo pirídico, núcleo isoquinoleico, núcleo fenantrénico y tropánico.

#### ***2.1.5. Métodos para la extracción de metabolitos***

Los metabolitos antes mencionados se pueden obtener mediante diferentes métodos de extracción (figura 3), los cuales se mencionan a continuación:

##### ***2.1.5.1. Extracción con disolventes***

Consiste en colocar la droga en contacto con el disolvente, capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar de la droga al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente se elimina el disolvente para concentrar los extractos. La obtención de extractos con disolventes es de los métodos más utilizados para la obtención de metabolitos activos. Se debe tener en cuenta los siguientes factores para obtener un correcto resultado (46, 47).

**Característica de la droga:** se debe trabajar con drogas desecadas y con un tamaño disminuido, esto con el objeto de obtener una mayor cantidad de principios activos.

**Naturaleza del disolvente:** principalmente es utilizado el agua y etanol, pero también son usados otros disolventes orgánicos como son la acetona, acetato de etilo y hexano entre otros (46).

**Temperatura:** el aumento de la temperatura aumenta la extracción de metabolitos activos de las drogas, ya que aumenta su solubilidad, pero al mismo tiempo, ocasiona la degradación de dichos compuestos. En ningún caso se debe utilizar temperatura elevada para obtener compuestos termolábiles (47).

**Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente:** el tiempo dependerá de las características de la droga (dureza de la planta) y de los principios activos (volátiles).

**Control de la difusión celular:** Esta se obtiene con un adecuado contacto entre la droga y el disolvente. Cuando se renueva el disolvente se mantiene una diferencia de la concentración de la droga en la planta y el disolvente, facilitando su extracción.

La extracción con disolventes puede catalogarse en dos grandes grupos: extracción continua y discontinua (46).

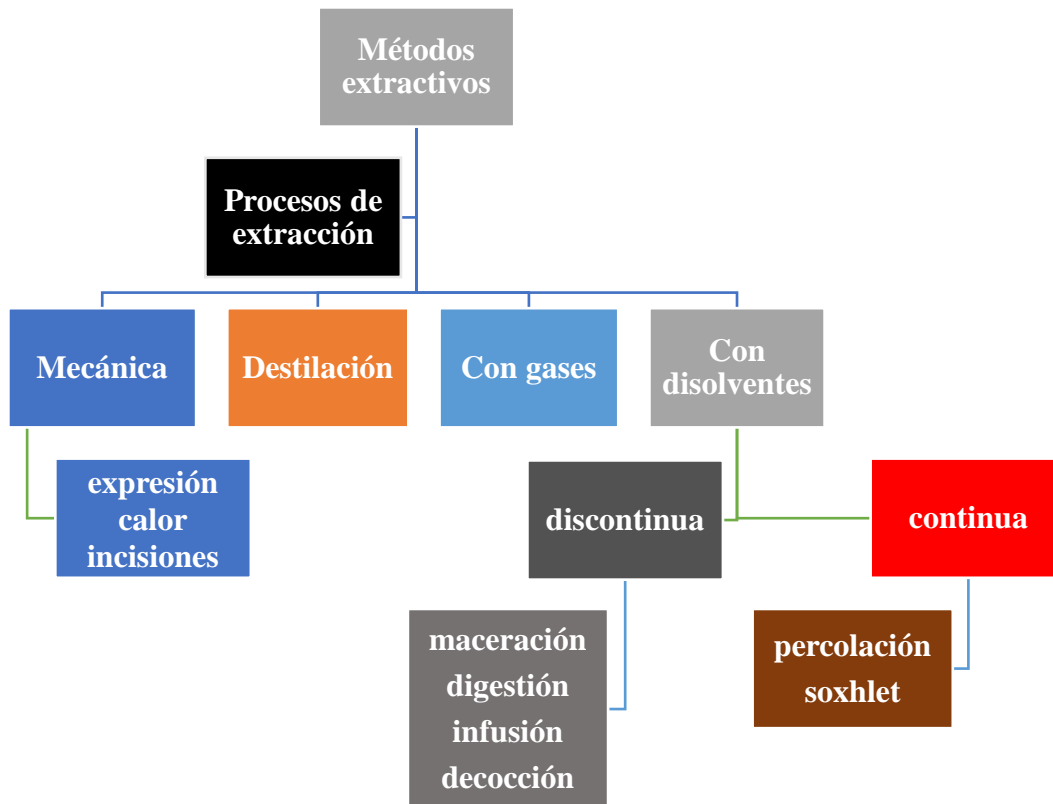


Figura 3. Métodos extractivos para la obtención de metabolitos secundarios.

### 2.1.5.2. Extracción discontinua o simultánea

La droga se sumerge en el disolvente, por lo que la totalidad de la droga tiene contacto con el disolvente y la difusión se lleva a cabo en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio. Los métodos de la extracción discontinua se observa a continuación (tabla 1).

**Tabla 1.** Métodos de extracción discontinua.

<b>Método</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Disolventes</b>
Maceración	Ambiente	Horas-días	Agua, mezclas hidroalcohólicas glicerina
Digestión	>Ambiente	Horas-días	Agua, mezclas hidroalcohólicas glicerina
Infusión	Próxima a la ebullición	1-2 min. hasta 30 min.	Agua
Decocción	Ebullición	15-30 min.	Agua

Estos métodos extractivos son reportados comúnmente en la etnofarmacología.

### 2.1.6. Plantas medicinales en la odontología

Los padecimientos odontológicos no son la excepción; algunos tratamientos para enfermedades bucales son la clorhexidina, agua oxigenada, los cuales ocasionan pigmentación dental y de las restauraciones directas tal cual como resinas, además de atrofia de las papilas gustativas por lo tanto el uso de plantas con propiedades relacionadas a la higiene dental así como curativas en estados patológicos (tabla 2), se han utilizado desde tiempos antiguos, como el uso de palillos con algún efecto sedante o mascar distintas plantas con usos antimicrobianos, son ejemplos usados en algunas tribus africanas (48). En México la utilización de plantas con propiedades medicinales es amplia y se ve reflejada en la variedad de géneros y usos aplicados a el área odontológica, siendo los más utilizados las infusiones con fines analgésicos, aunque también destacan las formulaciones en forma de chicles (3). Por lo tanto se conduce a un estudio de plantas con efectos terapéuticos bucales como las que a continuación se presentan:

**Tabla 2.** Plantas más comúnmente utilizadas para padecimientos bucales a nivel mundial.

Nombre popular	Nombre científico	Uso en enfermedades bucales	Fuente
Sanguinaria	<i>Polyginum aviculare</i>	Gingivitis	(49)
Sangre de drago	<i>Croton lecheri</i>	Analgésico antimicrobiano, antiinflamatorio y periodontopatías	(50, 51)
Cuachalate	<i>Amphiterygium adstringens</i>	Periodontopatias	(52)
Ajo	<i>Allium savitum</i>	Candidiasis, antibiótico	(53)
Clavo de olor	<i>Sizygium aromaticum</i>	Odontalgias, alveolitis	(13)
Corteza de Roble	<i>Quercus robo</i>	Estomatitis	(51, 53)
Esquinase purpurea	<i>Equinacea angustifolia</i> sp.	Candidiasis	(54)
Manzanilla	<i>Matricaria chamomille</i>	Inflamación y odontalgias	(55)
Menta	<i>Menta piperita</i>	Anticariogénico, antiinflamatorio, periodontopatias	(51, 53)
Ortiga	<i>Urtica dioica</i>	Astringente en periodontopatias	(53)
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Odontalgias e inflamación del periodonto	(13)
Cacao	<i>Theobroma cacao</i>	Bacteriostático en <i>S. mutans</i>	(56)
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Disminución de niveles séricos en enfermedad periodontal	(57)
Romero	<i>Rosmanirus officinales</i>	Inhibitorio de <i>S. mutans</i> y <i>L. acidophilus in vitro</i>	(58)
Salvia	<i>Salvia officinales</i>	Prevención y tratamiento de Gingivitis	(59)
Té verde	<i>Camellia sinensis</i>	Anticariogénico	(60)
Encino	<i>Quercus ilex</i>	Periodontopatias	(51)
<i>C. sonderianus</i>	<i>Croton sonderianus</i>	Periodontopatias	(51)
Cabello de ángel	<i>Caliandra grandiflora</i>	Anticariogénico	(51, 61)
Pata de león	<i>Geranium</i> sp.	Movilidad dental	(53)
Sangre de grado	<i>Jatropha dioica</i>	Movilidad dental	(50)
Guayaba	<i>Psidium guajava</i>	Periodontopatias	(51)
Siempre viva	<i>Sedum praealtum</i>	Gingivitis	(51)
<i>C. chichenensis</i>	<i>C. chichenensis</i>	Antifúngico	(62, 63)

### 2.1.6.1. Familia Euphorbiaceae

La familia *Euphorbiaceae* abarca un gran número de géneros ampliamente usados como remedios para distintas enfermedades, como por ejemplo, para tratamiento de infecciones de piel, heridas, migraña, parásitos intestinales, anticanceroso y antimicrobiano, por mencionar los más importantes; debido a su vasta distribución a lo largo de todo el mundo. presenta cinco subfamilias que son: *Phyllanthoideae*, *Oldfieldioideae*, *Acalyphoideae*, *Crotonoideae* y *Euphorbioideae* (64).

### 2.1.6.2. Género *Croton*

En la tabla anterior (tabla 2) se presentan a algunas especies del género *Croton*, el cual pertenece a la familia *Euphorbiaceae*. En la tabla 3 se proporciona la descripción botánica de la especie *Croton hypoleucus*, del género *Croton*, cuyas partes aéreas son comúnmente utilizadas para la realización de extractos; por ejemplo, las hojas, tallo, flores y látex. Esta familia es la sexta más diversa entre las angiospermas, presenta dos centros de diversificación importantes: uno en Asia con 34.32% de los géneros y otro en América que tiene el 32.8% de los mismos; la familia *Euphorbiaceae* tiene más de 8,000 especies a nivel mundial y se puede destacar particularmente a México con 43 géneros y 782 especies (14).

**Tabla 3.** Taxonomía de *Croton hypoleucus*.

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Malpighiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Euphorbiaceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Crotoneae</i>
<b>Género</b>	<i>Croton</i>
<b>Especie</b>	<i>Hypoleucus</i>

### 2.1.6.3. *Croton hypoleucus*

Perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* (14, 65), arbusto o hierba de 1 m a 1.20 m de altura, hojas alternas y algunas veces lobadas, nervadura pinnada; presentan inflorescencias racemosas, fruto en capsula, semillas cilíndricas y comprimidas (fig. 4). La caracteriza la presencia de tricomas estrellados en las hojas (14).





**Figura 4.** Arbusto de *Croton hypoleucus*.

El endemismo del género alcanza el 80.59%. Entre los géneros más diversos encontramos, *Crotón* con más de 800 especies y *Jatropha* con 175, ambos distribuidos principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo. En México encontramos 6 tribus y 8 géneros, de los cuales, el 53% son endémicos de selvas bajas y matorrales xerófilos; en México se encuentran 130 especies del género *Croton*. Es importante decir que aunque existen algunas especies de géneros como *Crotón* y *Euphorbia* en zonas templadas, el área de preferencia para la familia son las tropicales y subtropicales (14).

#### **2.1.6.4. Usos medicinales del género *Croton***

El género *Crotón* ha sido motivo de estudios fitoquímicos debido a las posibilidades terapéuticas que han podido ser identificadas en estas plantas (tabla 4y 5); una de las más estudiadas, por su uso en el tratamiento de cáncer e inflamaciones es *Croton lecheri* (65). Un ejemplo del uso de este género, es la decocción de las hojas de *C. antisiphiliticus*, la cual se utiliza contra enfermedades venéreas, como diurético y contra la mordedura de serpiente (65).

Por su parte *C. bonplandianus* es utilizada como antiséptico; inclusive se ha informado que el extracto acuoso de la especie *C. caudatus* ha sido usada contra la malaria (66, 67). En otras regiones de América como en la amazónica, especialmente en Colombia, Ecuador, Perú y

Bolivia, se les conoce como sangre de drago a unas pocas especies del género *Croton*, productoras de una resina de color rojo vinoso, a las que también se han identificado propiedades medicinales (68).

Publicaciones en Perú sobre cinco especies del género *Croton*, dos han recibido especial atención por parte de los investigadores: *C. palanostigma* Klotsch y *C. lechleri* muell (69) con un característico sabor astringente. La sangre de drago es usada en forma tradicional desde tiempos muy antiguos y en la actualidad se ha demostrado sus propiedades medicinales como cicatrizante, antiviral, antiinflamatorio, por su contenido en alcaloides y taspina además del principio SP-303 (70), una proantocianidina oligomérica; también es excelente antiinflamatorio para uso externo (7), para el tratamiento de úlceras gástricas, usándose también para el uso del acné y eleva las defensas del organismo (71).

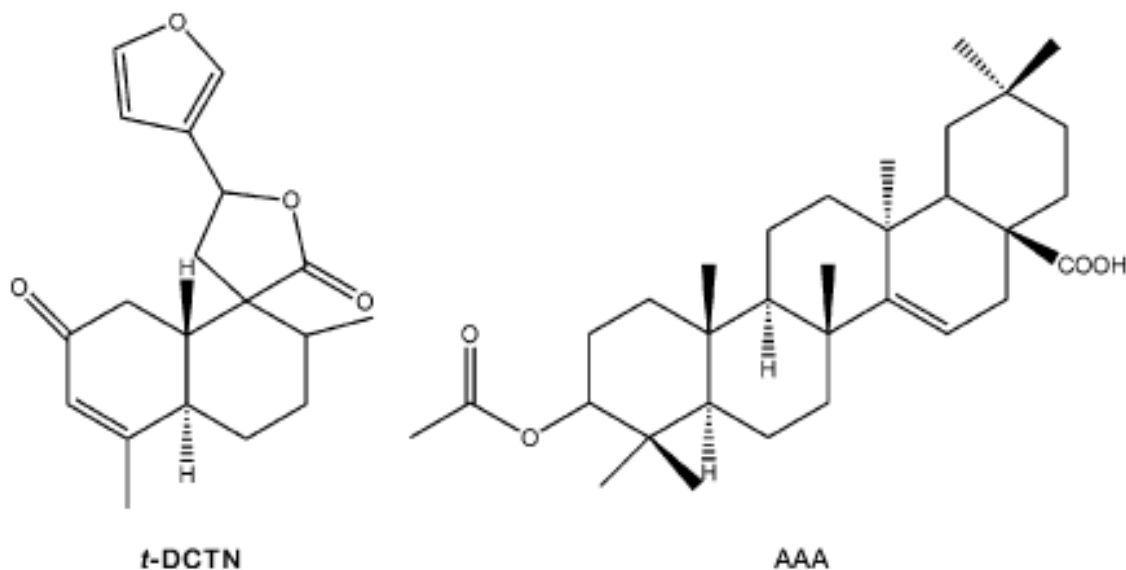
En estudios *in vivo* del uso de *Croton palanostigma* (Sangre de Drago) se demostró su acción cito-protectora sobre la mucosa gástrica administrando el látex por vía oral a una dosis de 0.8 ml/kg en ratas, mediante la estimulación de producción de moco gástrico, utilizando como control positivo ranitidina; se realizó ligadura pilórica y se midió cantidad de jugo gástrico y pH. además actividad de pepsina (72).

Se ha descrito también el mecanismo de acción cicatrizante de algunos tipos de *Croton*, mediante la purificación de su principio activo denominado taspina, la cual tiene un efecto directo sobre la migración celular y la síntesis de colágeno, lo que activa la cicatrización así como su actividad anti inflamatoria, la cual es una propiedad interesante en caso de tener aplicación a la enfermedad periodontal, debido a que el colágeno es parte importante en este padecimiento (73).

También se han encontrado algunos oligómeros (proantocianidinas) los cuales tienen una actividad antiviral en cultivos celulares, principalmente en tipos de herpes, hepatitis A y B, además de que pueden relacionarse a la prevención de enfermedades; presentan rol frente a radicales libres principalmente como antioxidantes, motivo de investigación en casos de cáncer (74).

De *C. cajucara* se han aislado terpenos, neo-clerodanos tipo furanos como trans-dehidrocrotonina y ácido acetil aleuritólico (fig. 5) de los cuales se observó un efecto contra *Tripanosoma cruzi* en células infectadas; teniendo efecto inhibitorio a una CI<sub>50</sub> para el extracto

metanólico de 40 µg/ml, para los clerodanos aislados la  $CI_{50}$  fue de 274 µg/ml y 109 µg/ml. Otro efecto reportado es antinociceptivo bajo los modelos de la formalina subplantar y del ácido acético y placa caliente en ratones suizos a una concentración de 100 y 200 mg/kg (65, 75).



**Figura 5.** Clerodanos aislados de *C. cajucara*.

*C. caudatus* se estudió su efecto junto con *Tiliacora acuminata* contra del vector filarial de *Culex quinquefasciatus* a 0.1 y 0.2% 1:1 de los extractos crudos (Cloroformo, Acetato de etilo y benceno) a 72 horas (67) presentándose sinergismo, ya que al usarlas por separado tuvo menor eficacia que juntas. Con *C. jatrophioides* se usó como anti-alimentador en insectos (76).

*C. celtidifolius* ha comprobado su efecto Antinociceptivo en modelo de la formalina y test de contracciones (8) además de antioxidante; esto en ratones machos suizos, frente al extracto de crudo etanol a una concentración de 100 y 300 mg/kg inhibiendo en un 60-75% el número de contracciones.

Una propiedad similar la demostró *C. malambo* como antiinflamatorio y antinociceptivo (77), administrando el extracto acuoso de su corteza a ratones albinos por vía intra peritonealmente a una concentración de 6.15 mg/Kg en comparación con ácido acetil salicílico y diclofenaco sódico, evaluándose también toxicidad  $DT_{50}$  12.3 mg/kg y  $DL_{50}$  esta fue de 4,096 mg/Kg con un tiempo pico en 10 minutos (8, 67, 75).

*C. chichenensis* tiene efecto anti fúngico por el método de difusión en disco frente a hongos que afectan la cosecha como el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* responsable de antracnosis (62).

*C. cuneatos* se observó su actividad antiinflamatorio del extracto acuoso a una dosis de 7 mg/kg, en modelo de ratas Sprague-Dawley, en modelo de inflamación plantar, por la administración de sero-albúmina (78).

*C. flavens* se han evaluado sus aceites esenciales en líneas celulares humanas con cáncer, en carcinoma de pulmón A-549 y línea celular de adenoma carcinoma de colon DLD-1, donde la GI-50 para A-549 fue de  $27 \pm 4$   $\mu\text{g/ml}$  y para DLD-1 fue de  $28 \pm 3$   $\mu\text{g/ml}$  (17, 62).

*Crotón lecheri* (*Crotón drago*) el cual ha sido el más estudiado por sus usos en el tratamiento del cáncer e inflamaciones además de antiviral donde se obtuvo el compuesto SP303. Otras especies como es el *C. antisiphiliticus* se utiliza contra enfermedades venéreas, como diurético y contra la mordedura de serpiente. Por su parte *C. bonplandianus* es utilizada como antiséptico (66, 79).

*C. lobatus* mostro actividad antiplasmódica hacia *Plasmodium falciparum* a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Teniendo mayor sensibilidad el extracto de metanol de sus partes aéreas con un  $\text{CI}_{50}$  de 0.38  $\mu\text{g/ml}$  (80). En estudios similares de *Croton urucurana* demostró tener efecto antibacterial frente a microorganismos como son *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* los cuales presentaron efecto *in vitro* antibacteriano de los compuestos polares (10).

**Tabla 4.** Uso farmacológico del género *Croton*.

<b>Especie</b>	<b>Efectos comprobados</b>
<i>C. cajuara</i>	Antinociceptivo, se usa en enfermedad de Chagas
<i>C. caudatus</i>	Antiplasmódico
<i>C. celtidifolius</i>	Antinociceptivo, antiinflamatorio
<i>C. chichenensis</i>	Antifúngico
<i>C. cuneatus</i>	Antiinflamatorio
<i>C. flavens</i>	Antitumoral
<i>C. lecheri</i>	Antiviral, antiinflamatorio y anticancerígeno
<i>C. antisiphiliticus</i>	Contra enfermedades venéreas
<i>C. bonplandianus</i>	Antiséptico
<i>C. lobatus</i>	Antiplasmódico
<i>C. oblongifolius</i>	Hepatoprotector

**Tabla 5.** Especies de *Croton* con efecto antibacteriano.

<b>Especie</b>	<b>Metabolitos secundarios identificados</b>	<b>Bacterias evaluadas</b>
<i>C. bonplandianum</i>	Alcaloides	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>
<i>C. urucurana</i>	Catequinas, galocatequinas y esteroides	<i>Salmonella typhimurium</i> y <i>S. aureus</i> a 5 y 2 mg/ml
<i>C. sonderianus</i>	Diterpenos (ácido entbeyer-15-en-18 oico)	<i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S.</i> <i>sanguinis</i> , <i>S. sobrinus</i> y <i>S.</i> <i>salivarius</i>
<i>C. steenkampianus</i>	Flavonoides y Diterpenos	<i>Plasmodium falciparum</i> 5.80 y 8.60 µg/ml
<i>C. zenhtneri</i>	Diterpenos	<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022) 1000 µg/ml

#### **2.1.6.5. Género *Croton* en enfermedades bucales**

El género *Croton* ha sido motivo de estudio en algunos padecimientos bucales (tabla 6), como por ejemplo en alveolitis, antifúngico frente a *Candida albicans* (63) analgésico y antimicrobiano contra *S. mutans* (61).

**Tabla 6.** Principales usos del género *Croton* en enfermedades bucales.

<b>Género</b>	<b>Uso</b>	<b>Modelos</b>
<i>C. lecheri</i>	Alveolitis, antiviral	Relleno alveolar a base de <i>Aloe vera</i> en <i>Cavia porcellus</i>
<i>C. chichenensis</i>	Anti fúngico: <i>C. albicans</i>	Difusión en disco
<i>C. draco</i>	Antimicrobiano	Microdilución en caldo
<i>C. cajucara</i>	Anticariógeno	Suspensiones celulares y biopelícula artificial

#### **2.1.6.6. *Leucophyllum frutescens***

El género *Leucophyllum* pertenece a la familia *Scrophulariales* (tabla 7), crece desde la parte norte de América de Texas a la zona centro de nuestro país, creciendo en zonas áridas a semiáridas. Crece en forma de arbusto semi-redondo, caducifolio, de 0.9 a 2.4 m de altura, con hojas alternadas, pubescentes y ovaladas o elípticas color azul gris; comprenden entre 200 a 300 géneros y de 4,000 a 5,000 especies.

**Tabla 7.** Taxonomía de *L.frutescens*.

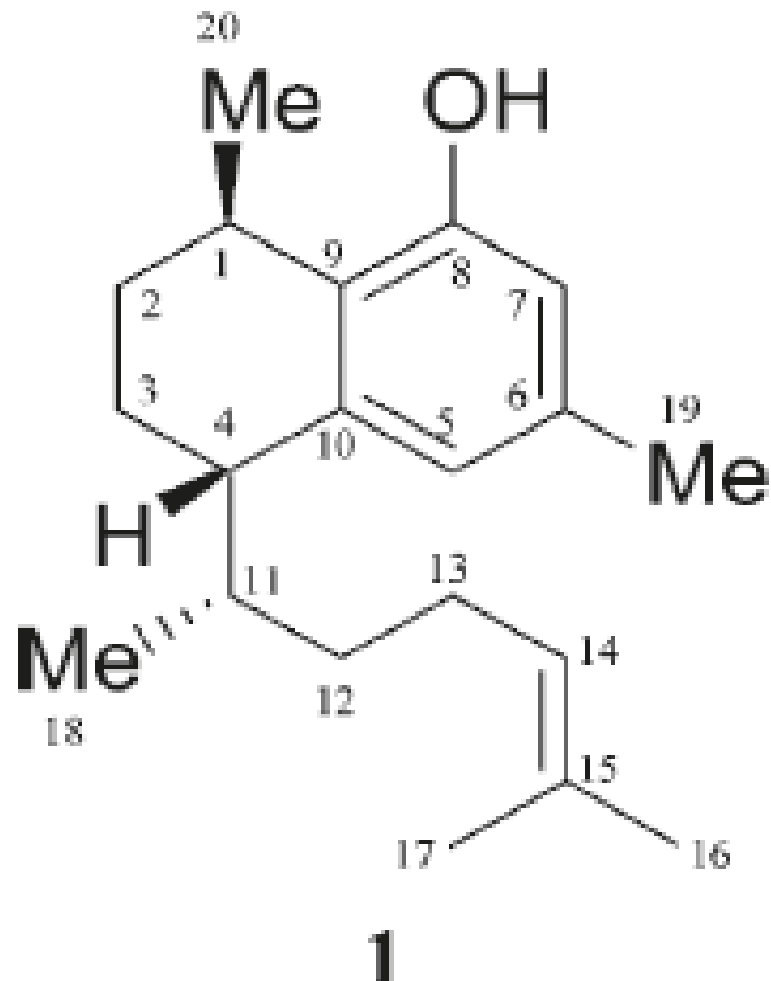
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Orden</b>	<i>Scrophulariales</i>
<b>Familia</b>	<i>Scrophulariaceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Leucophylleae</i>
<b>Género</b>	<i>Leucophyllum</i>
<b>Especie</b>	<i>frutescens</i>

Es variado el uso medicinal de la familia *Scrophulariaceae*, pero principalmente se utiliza en padecimientos en las vías aéreas como tos, infecciones e incluso tuberculosis y asma; también se emplea como cicatrizante, antioxidante, vasodilatador y analgésico entre otros. El género *Leucophyllum* cuenta con 28 especies. Entre los principales estudios farmacológicos realizados a este género tenemos:

Antibacteriana frente a *Streptococcus aureus* con CMI de 62 µg/ml y *Streptococcus pneumoniae* con CMI de 125 µg/ml evaluado por método de dilución en agar (81), antituberculoso y hepatoprotector induciendo el daño con tetracloruro de carbono, se midió la actividad en plasma de la alanina aminotransferasa, se les administró 100 y 200 mg/kg de extracto de metanol (82).

Se observó su efecto como antituberculoso y antimicrobiano frente a *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* de los extractos de metanol y acuoso de 14 plantas que crecen en la parte norte de nuestro país, entre las que se evaluó a *L. frutescens*; concluyendo que el extracto de metanol tuvo efecto contra *Streptococcus pneumoniae* con una CMI de 500 µg/ml y con 125 µg/ml frente a *Mycobacterium tuberculosis* (81).

Entre los compuestos aislados de este género se encuentran: Diterpenos (leubetanol) (83), compuestos fenólicos como lignanos; polialcoholes como manitol, esteroides (84). Se aisló un diterpeno (leubetanol figura 6) comprobando su efecto contra *Mycobacterium tuberculosis* con una CMI de 6.25-12.50 µg/ml (83).



**Figura 6.** Leubetanol aislado de *L. frutescens*.

Como hepatoprotector, se realizó un estudio en ratas ocasionándoles daño hepático con tetracloruro de carbono y posteriormente administrando el extracto de metanol de *L. frutescens* a concentraciones de 100 y 200 mg/kg; se observó histopatológicamente una regeneración del daño celular (82).

## 2.2. Justificación

La enfermedad periodontal, representa un problema de salud pública en México, teniendo en algunos estados del país, la prevalencia de hasta el 60% en población escolar entre

6- 14 años. La Organización Mundial de la Salud, ha reportado que entre un 5 a 15% de la población mundial tiene periodontitis en estado avanzado en población adulta (OMS, 2004. Ginebra) además de presentar un gasto en materia de salud (OMS).

Dentro del estado de Hidalgo, contamos con una amplia flora; entre estas el género *Croton*, del cual algunas especies como *hypoleucus* son endémicas de nuestro país, el género cuenta con investigaciones previas como antimicrobianas, analgésicas, antivirales así como anticancerígeno entre otros, este género tiene la característica de la presencia de Diterpenos (85-87). La especie *C. hypoleucus* no ha sido objeto de investigaciones previas, por lo tanto se aporta un nuevo resultado a la investigación.

### **2.3. Hipótesis**

- Los extractos de *Croton hypoleucus* y *Leucophyllum frutescens* tienen efecto antimicrobiano *in vitro*, frente a bacterias patógenas relacionadas a enfermedad periodontal.

### **2.4. Objetivos**

#### ***2.4.1. Objetivo general***

- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de *Crotón hypoleucus* y metanol de *Leucophyllum frutescens*.

#### ***2.4.2. Objetivos específicos***

- Obtener los extractos de hexano acetato de etilo, metanol por maceración.
- Evaluar la actividad antimicrobiana por método de microdilución en caldo *in vitro* los extractos de *Crotón hypoleucus* y *Leucophyllum frutescens*.
- Aislar metabolitos mayoritarios.
- Evaluar los metabolitos mayoritarios puros como antibacterianos.
- Determinar la CI<sub>50</sub> para: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Parvimonas micra*, *Actinomyces viscosus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans*.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se diseñó y desarrolló considerando dos enfoques y disciplinas diferentes: fitoquímica y microbiología (determinación de actividad antibacteriana).

#### 3.1. Fitoquímica

##### 3.1.1. *Colecta de material vegetal*

El material botánico de *Croton hypoleucus* (partes aéreas) fue colectado en el mes de septiembre del año 2011 y febrero 2013 en la comunidad de San Vidal Km. 55 carretera Tulancingo-Acaxochitlán municipio de Tulancingo (20°07'00.41N, 98°18'26.00 O). *Leucophyllum frutescens* fue colectado en el mes de Agosto en el municipio de Meztlán la mesa (19°35'52N, 97°57'27°). Las plantas fueron identificadas por el botánico M.C. Manuel González Ledesma del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, quedando en el herbario para su archivo, con número de voucher: DVM01 *Croton hypoleucus*, DVM01 *Leucophyllum frutescens*.

Durante la colecta se observó el hábitat, la zona es totalmente rural con solo 250 habitantes; creciendo los especímenes en suelos empinados junto a bosque de pino y roble, en clima templado (18 a 20°C) con lluvias moderadas durante el verano en el caso de *Croton hypoleucus*; *Leucophyllum frutescens* se recolecto en la Mesa (Meztlán) la cual se caracteriza por tener clima seco con pocas lluvias y suelo mineralizado.

##### 3.1.2. *Obtención de extractos*

Se utilizaron solo partes aéreas (hoja, tallo), secadas a temperatura ambiente 20-25°C a la sombra durante 15 días (fig. 7), con el objeto de disminuir la partícula se utilizó triturador de maíz eléctrico marca REY (fig. 8); los extractos fueron obtenidos por maceración, usando como disolventes hexano (5 L/500 g), acetato de etilo, metanol a temperatura ambiente por 8 días; el extracto acuoso (100 ml/40 g) se obtuvo por infusión. Para la eliminación del disolvente se utiliza rota vapor a 40°C a baja presión (fig. 9).



**Figura 7.** Secado del material vegetal.



**Figura 8.** Disminución de la partícula del material vegetal.



**Figura 9. Eliminación del disolvente con rotaevaporador.**

De los extractos de hexano, de acetato de etilo, metanol y acuoso de *Croton hypoleucus* se llevó a cabo dos colectas, la primera en el mes de agosto 2011 y la segunda en el mes de febrero 2013; por lo tanto se obtuvieron dos rendimientos (tabla 8). De *Leucophyllum frutescens* solo se realizó una colecta.

**Tabla 8.** Rendimiento de los extractos obtenidos en dos épocas del año distintas.

<b>Especie</b>	<b>Hexano 5 L</b>		<b>Acetato de etilo 5 L</b>		<b>Metanol 5 L</b>		<b>Agua 100 ml</b>
<i>C. hypoleucus</i> (agosto; 500 g)	10 g	2%	30 g	6%	55 g	11%	
<i>C. hypoleucus</i> (agosto; 40 g)							1.5 g
<i>C. hypoleucus</i> (febrero; 500 g)	18 g	3.8%	N/A		50 g	10%	N/A
<i>L. frutescens</i> (500 g)	N/A		N/A		80 g	14%	NA

### ***3.1.3. Disolución de los extractos***

Se hicieron pruebas de solubilidad de los extractos con DMSO, Tween 20 y 80 además de agua y etanol al 78% y al 99%, teniendo mejores resultados el etanol al 99% como mejor disolvente de los 5 extractos.

Una vez llevadas a cabo las pruebas de disolución de los extractos, se realizaron los stocks de los cuatro extractos, con el fin de tener la concentración deseada para llevar a cabo las pruebas.

Para la prueba piloto se disolvieron 150 mg de extracto en 15 ml de etanol al 99% para tener una concentración de 10 mg/ml, fueron esterilizados por filtración a un tamaño de microporo de 0.2  $\mu\text{m}$  y vertido en crioviales de 2 ml estériles, los cuales se colocaron en caja de cartón y etiquetados para después ser almacenados a 4°C hasta su utilización. Posteriormente para la evaluación se decidió disolver 300 mg en 15 ml de etanol al 99% marca Sigma-Aldrich, el motivo se explica más adelante (fig. 15).

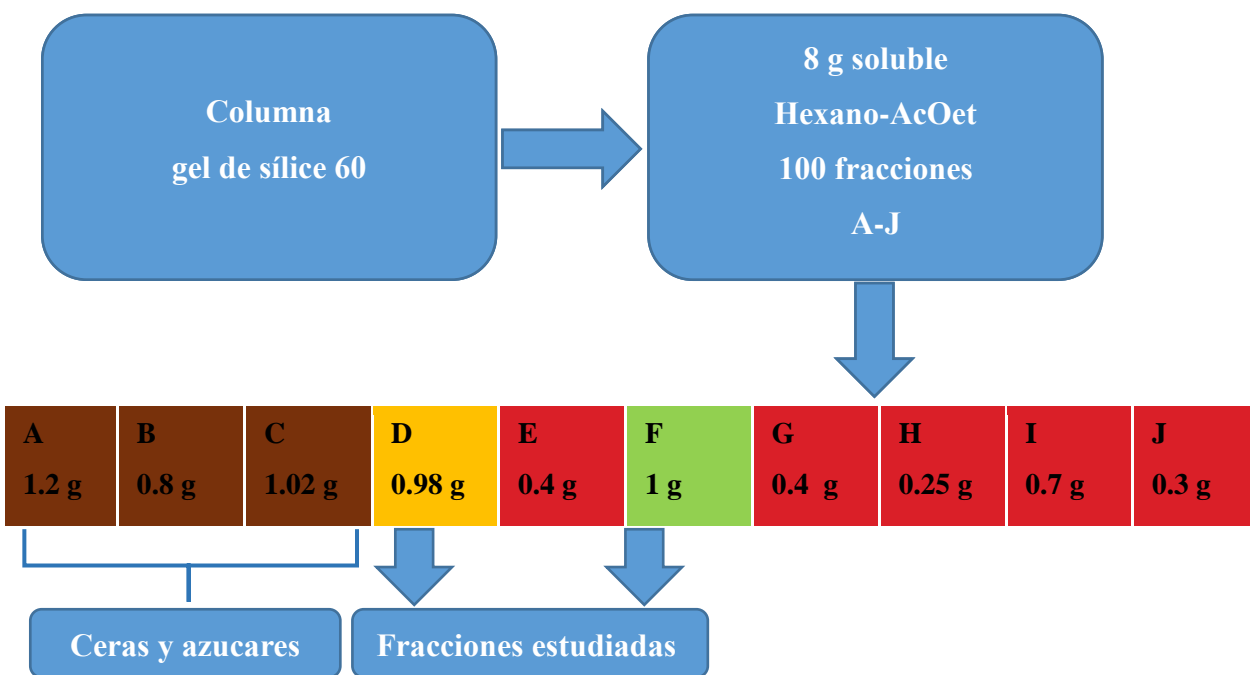
Se emplearon los extractos a diferentes concentraciones, los cuales se encontraban almacenados al vacío y a temperatura de 4°C, previo a su utilización.

### ***3.1.4. Caracterización e identificación de compuestos mayoritarios***

Se sometió a columna en gel sílice 60 (figura 10), la parte soluble en metanol (8 g), con polaridad de columna 69:1 Hexano-Acetato de etilo en polaridad ascendente hasta 60:10 (tabla 9), colectándose fracciones de 7 ml y preparando 210 ml de cada polaridad, se usó una polaridad de placa 8:2 Hexano-AcOet obteniéndose las siguientes fracciones (tabla 10 y 11).



**Figura 10.** Columna de gel sílica 60 para extracto de hexano.



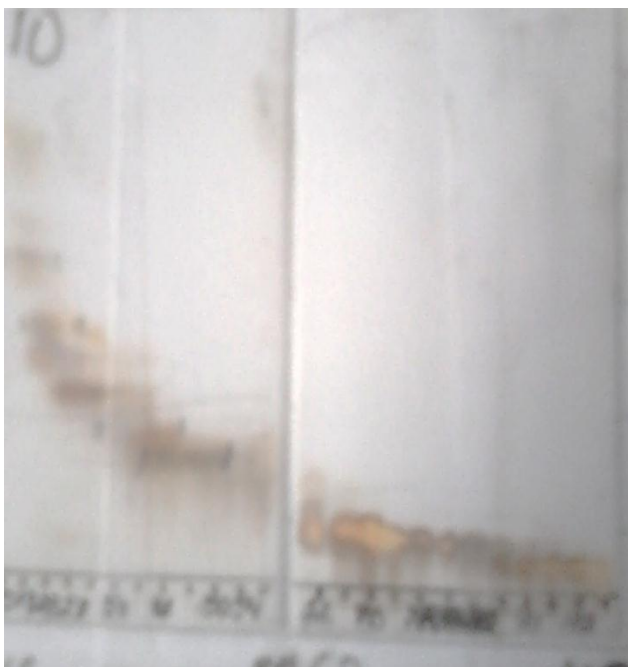
**Figura 11.** Esquema del proceso de separación de las fracciones obtenidas de la columna gel sílice 60.

**Tabla 9.** Polaridades utilizadas para la separación de fracciones.

<b>Polaridad</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Fracciones</b>
69: 1	Hexano-AcOet	1-10
68: 2	Hexano-AcOet	11-20
67: 3	Hexano-AcOet	21-30
66: 4	Hexano-AcOet	31-40
65: 5	Hexano-AcOet	41-50
64: 6	Hexano-AcOet	51-60
63: 7	Hexano-AcOet	61-71
62: 8	Hexano-AcOet	71-80
61:9	Hexano-AcOet	81-90
60:10	Hexano-AcOet	91-100

Después de realizar cromatografía en capa fina y de acuerdo a su perfil cromatográfico (figura 12), se juntan las fracciones de la siguiente manera (tabla 10) y se cuantifica su rendimiento:





**Figura 12.** Cromatografía de capa fina parte soluble del extracto de hexano.

**Tabla 10.** Agrupación de las fracciones obtenidas de parte soluble del extracto de hexano así como rendimiento.

<b>Fracciones</b>	<b>Grupo colectado</b>	<b>Cantidad</b>	<b>% Rendimiento respecto al extracto de hexano</b>
1-16	A	1.2 g	15%
17-23	B	0.8 g	10%
24-32	C	1.02 g	12.75%
33-50	D	0.98 g	12.25%
51-61	E	0.5 g	6.25%
62-69	F	1 g	12%
70-77	G	0.9 g	11%
78-100	H	0.8 g	10%

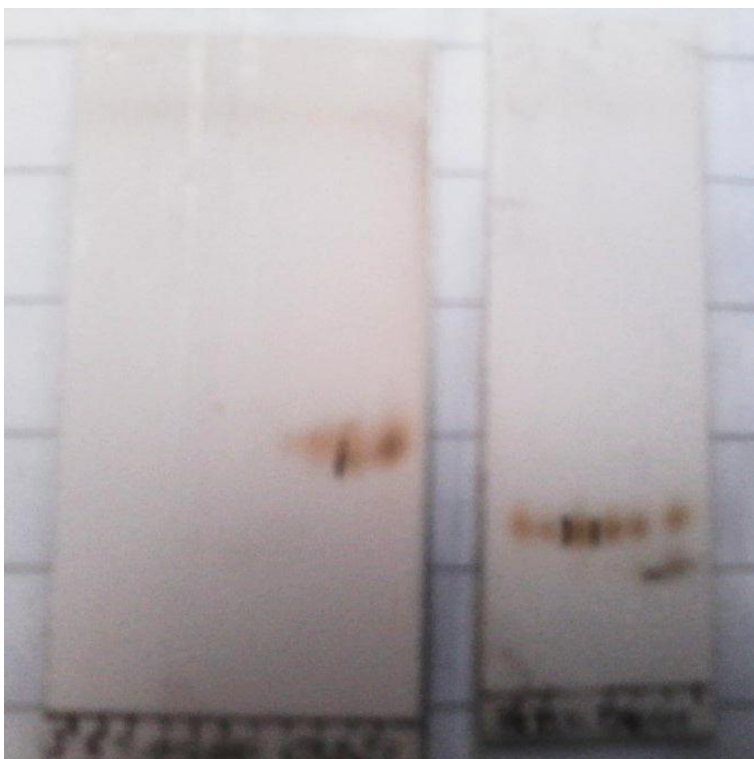
#### **3.1.4.1. Fracción D**

Se procede a la separación y elucidación de esta fracción debido a la abundancia y perfil cromatográfico en columna con gel sílice 60; se realizó una cromatografía en placa fina (figura 13), y se utilizó para polaridad de placa: hexano-éter 7:3 y polaridad de la columna hexano-acetona 40:1. Se obtuvieron 44 fracciones partir de 1 g, en el siguiente orden (tabla 11):



**Tabla 11.** Fracciones obtenidas de la columna de la fracción D.

<b>Polaridad</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Fracciones</b>
40: 1 ml	Hexano-Acetona	1-25
40: 1 ml	Hexano- Acetona	26-35
40: 1 ml	Hexano- Acetona	36-44 comp. aislado
30 ml	Acetona	45



**Figura 13.** Cromatografía en capa fina del labdano 2.

Por perfil cromatográfico se juntó las fracciones de la 1 a la 25, 26-35 se observó dos compuestos juntos y de la 36-44 se observa un solo (figura 13) compuesto, por lo cual se le envía a RMN (figura 25,26 y 27) se asigna como labdano 2 de acuerdo a las señales obtenidas por la RMN de  $H^1$  y  $C^1$ , lo cual fue corroborado por medio de HSQC la cual no ha sido previamente descrita.

#### **3.1.4.2. Fracción F: labdano 1**

Se realizó la separación de la fracción F del extracto de hexano, debido a su abundancia y perfil cromatográfico, se separó en columna gel sílice 60 (1 g); columna 100 ml X 15 mm; polaridad de la placa 97.5:2.5 (figura 14) diclorometano-benceno, polaridad de la columna 98:

2 diclorometano-benceno y se colocó 1 g de compuesto, obteniéndose las siguientes fracciones:

**Tabla 12.** Fracciones colectadas de la columna F.

<b>Polaridad</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Fracciones</b>
98: 2	Diclorometano-Benceno	1-12
98: 2	Diclorometano-Benceno	13-14 compuesto
98: 2	Diclorometano-Benceno	15-24
98: 2	Diclorometano-Benceno	25-47
100%	Acetato de etilo	48

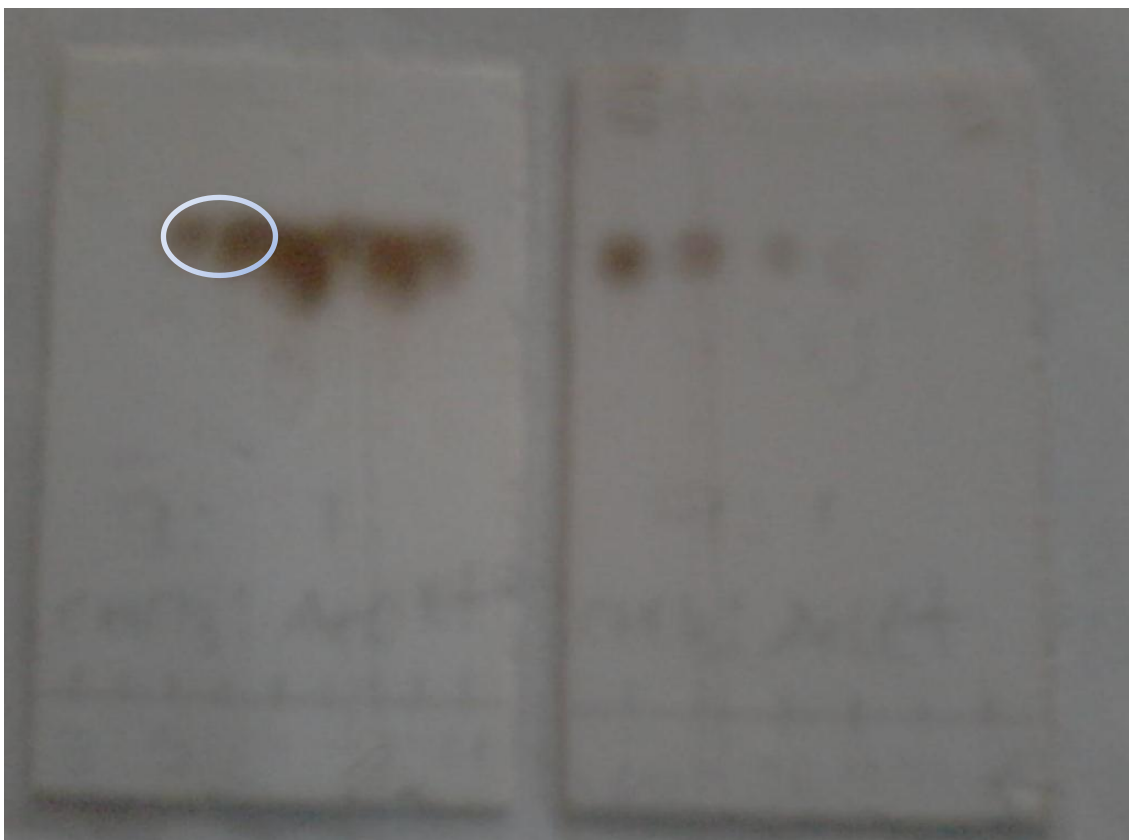
Se envía a RMN de  $C^{13}$ ,  $H^1$  y HSQC las fracciones 13 y 14 (figura 28,29 y 30)



**Figura 14.** Cromatografía en capa fina del labdano 1.

### 3.1.4.3. Fracción F: labdano 3

El labdano asignado como 3 se aisló de la fracción F, en columna gel sílice 60, con polaridad de placa 9:1 (figura 15) cloroformo-acetato de etilo y polaridad de columna 95:.5 en una columna 100 ml X 10 mm. Se obtuvieron 15 fracciones, de las cuales 1-4 se desecharon, la fracción 5 en adelante se obtiene el compuesto. Se identificó por medio de RMN de  $H^1$ ,  $C^{13}$  y HSQC (figura 31,32 y 33).



**Figura 15.** Cromatografía en capa fina del labdano 3.

### 3.1.4.4. Extracto de metanol de *Leucophyllum frutescens*

Se obtuvieron 80 g de extracto de metanol por maceración a partir de 500 g de planta seca, el cual se procedió a elucidación de compuesto debido a que mostro efecto importante durante la evaluación microbiológica. La separación se procedió en columna en Sephadex-LH 20 60 mm X 60 cm, en polaridad decreciente. Comenzando con 100% agua y terminando con 100% MeOH. Previamente se procedió a la eliminación de ceras con metanol-agua en proporción 1-1 a temperatura ambiente; obteniéndose un residuo insoluble (30 g) y un residuo soluble (50 g). La parte soluble se envió a RMN de  $H^1$  a 400 MHz (figura 58).

De la parte soluble se toman 30 g los cuales se someten a columna en Sephadex-LH 20 obteniéndose las siguientes fracciones (tabla 13):

**Tabla 13.** Fracciones obtenidas del extracto de metanol parte soluble.

<b>Polaridad</b>	<b>Disolventes</b>	<b>Peso</b>
Agua	100%	17.9
Agua-MeOH	9-1	1.4
Agua-MeOH	8-2	0.7
Agua-MeOH	7-3	1.2 g acteosido
Agua-MeOH	6-4	4.9 g acteosido
Agua-MeOH	5-5	2.5 g acteosido
Agua-MeOH	4-6	1.2 g
Agua-MeOH	3-7	0.8 g
Agua-MeOH	2-8	0.5 g
Agua-MeOH	1-9	0.2 g
Metanol	MeOH 100%	0 g

Donde de la fracción 4-6 se aisló un compuesto (figura 16), el cual por sus propiedades espectroscópicas se identificó como: acteosido mediante RMN  $H^1$  (figura 35) y  $C^{13}$  (figura 36) además de HMBC a dos enlaces (figura 37).



**Figura 16.** Cromatografía en placa fina de los fracciones 4-6 del acteosido revelador cloruro férrico.

## 3.2. Microbiología (determinación de actividad antibacteriana)

### 3.2.1. Especies bacterianas evaluadas

Se eligieron de acuerdo a la literatura y a conveniencia para el estudio, tratando de abarcar lo más posible los tres complejos bacterianos representativos de enfermedad periodontal; las bacterias fueron las siguientes (tabla 14): *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *C. gingivalis*, *V. parvula*, *P. micra*, *A. viscosus*, *A. actinomycetemcomitans* stp. a, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. sanguinis* y *S. mutans* (88, 89).

**Tabla 14.** Cepas de referencia.

Espece	Referencia (ATCC)
<i>P. gingivalis</i>	33277
<i>P. intermedia</i>	25611
<i>A. a. a</i>	43717
<i>S. sanguinis</i>	10556
<i>S. mutans</i>	25175
<i>A. viscosus</i>	43146
<i>P. micra</i>	33270
<i>F. n. n.</i>	25586
<i>C. gingivalis</i>	33624
<i>V. parvula</i>	10790

### 3.2.2. Condiciones de cultivo

Se utilizó medio de cultivo sólido agar soya tripticasa (AST) o caldo para *Mycoplasma* enriquecido con sangre de carnero desfibrinada y vitamina K (agar sangre) debido a los requerimientos y exigencias para el crecimiento de las especies bacterias seleccionadas para el estudio.

Las bacterias utilizadas (tabla 14) se encontraban almacenadas en crioviales, a temperatura de congelación a  $-78^{\circ}\text{C}$  en DMSO, se procedió a descongelarlas para sus posteriores transferencias, la cuales son dos, para garantizar la viabilidad y descartar la contaminación del cultivo. El sembrado inicial fue en césped y los dos posteriores por triple asa para garantizar la pureza bacteriana, la cual se ratificó con microscopio electrónico directamente sobre el cultivo, previo a la utilización y de acuerdo a la morfología bacteriana.

### 3.2.3. Determinación de concentraciones óptimas de estudio

Se realizó una prueba piloto con el objeto de encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI); se usó el método de microdilución en caldo a las siguientes concentraciones para la prueba piloto: 1 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg, 16 µg, 32 µg, 64 µg, 128 µg, 256 µg y 512 µg en caja de 96 pozos (figura 17), con el objetivo de estandarizar el método. Como control positivo, se utilizaron metronidazol y amoxicilina a concentraciones de 0.5 a 32 µg/ml, debido a que son medicamentos de uso común en el tratamiento de la enfermedad (90).

+	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		CH
B	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		CAC
C	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		CM
D	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		CA
E	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		LM
F												
G												
H												

**Figura 17.** Modelo para la determinación de las concentraciones óptimas, CH: *C. hypoleucus* extracto de hexano, CAC: *C. hypoleucus* extracto de acetato de etilo, CM: *C. hypoleucus* extracto de metanol, CA: *C. hypoleucus* extracto acuoso, LM: *L. frutescens* extracto de metanol.

En la columna A1: G1 100 µl de caldo más 100 µl de bacteria, como control del máximo crecimiento bacteriano. En la fila H1:H12 solo se colocó 200 µl de caldo como control negativo. De la columna A12:H11 se colocó 149.04 µl de caldo, más 40.96 µl de extracto; con la finalidad de colocar en este pozo la concentración balín o máxima concentración que tiene la función para realizar las diluciones seriadas a partir de estos pozos, en este caso la

concentración para la dilución de estos pozos fue de 1,024  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; los demás pozos contenían 100  $\mu\text{l}$  de caldo, se procedió a la dilución en cascada desde las filas A12: A2; transfiriendo desde el pozo A12 100  $\mu\text{l}$  hasta llegar a A2.

Para la obtención de la cantidad de extracto a colocar en cada pozo se utilizó la siguiente formula:

$$V1C1 = V2C2$$

Donde V es el Volumen y C concentración, donde la variable a despejar es V1.

Una vez que todos los pozos tienen la concentración deseada y en cantidad, quedan con 100  $\mu\text{l}$  cada uno. Se procede a realizar el Stock de la bacteria a evaluar; esto se realiza sacando las bacterias de la cámara de anaerobiosis, se llevó acabo hasta el momento que se utilizara, debido a que la mayoría de las bacterias a evaluar son anaerobias estrictas. Una vez que se retiran de la cámara de anaerobiosis, se observó la pureza de los cultivos bacterianos, al microscopio de acuerdo a su morfología.

El caldo utilizado para el experimento fue caldo mycoplasma base enriquecido con vitamina K y Hemina marca Sigma-Aldrich, el cual se esterilizo previamente y se preparó el día de su utilización; en tubos eppendorf de 2 ml estériles, se colocó 1.5 ml de caldo+ bacteria, para ajustar por absorbancia, a densidad óptica 1 a una longitud de onda de 600 nm mediante espectrofotómetro, ajustando como blanco el caldo; y así obtener la cantidad de células bacterianas a colocar en cada pozo para el experimento; quedando  $10^9/\text{ml}$  bacterias y de ahí se toman 100  $\mu\text{l}$  para colocar en otro Eppendorf que contiene 900  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo ( $10^8/\text{ml}$ ) de este se Stock se toman 10  $\mu\text{l}$  para cada pozo (figura 18).

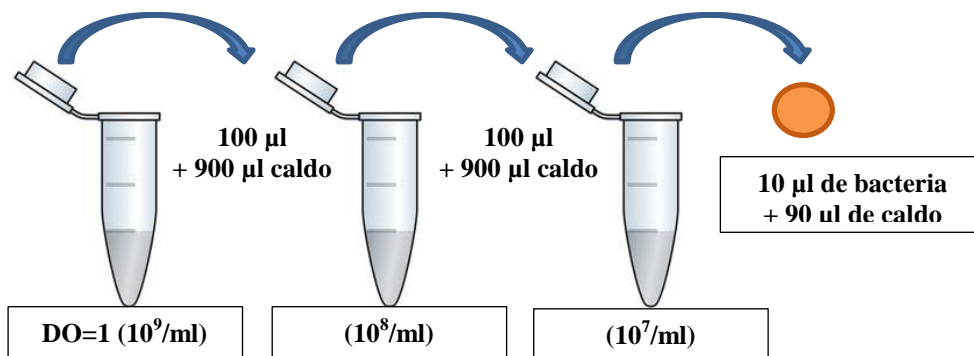
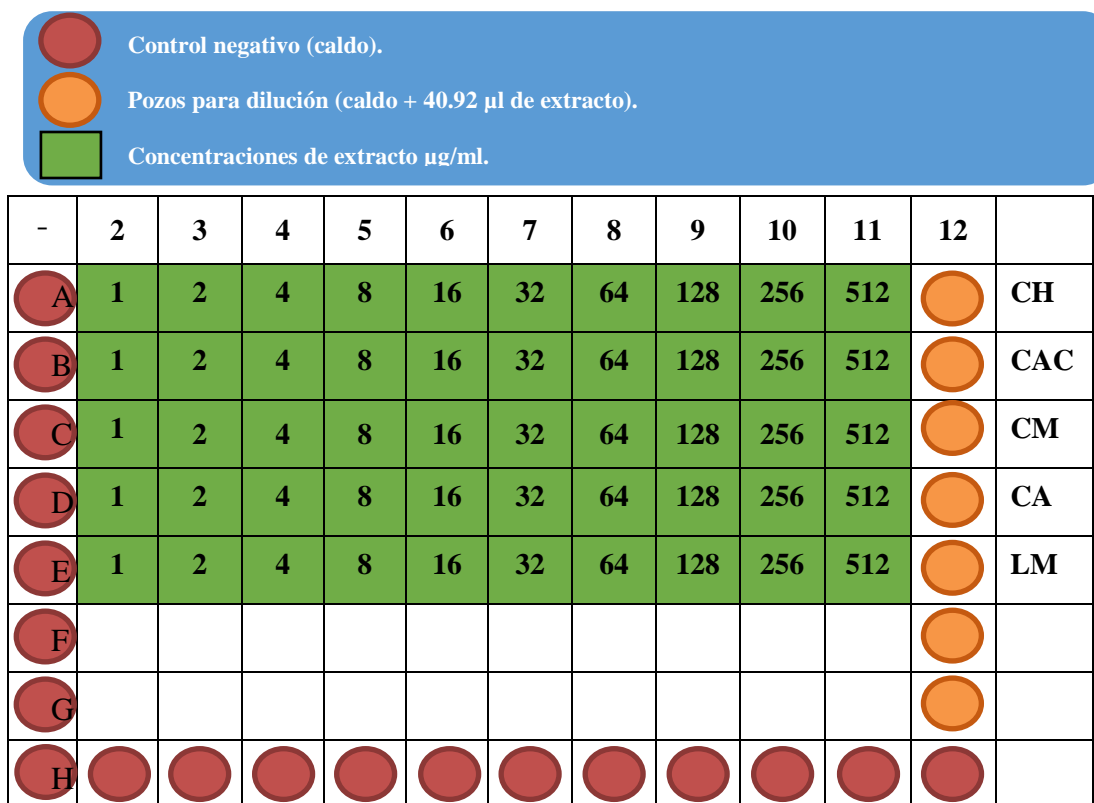


Figura 18. Pozos para diluciones seriales.

Se colocó 10 µl de bacteria + 90 µl de caldo en cada pozo, después de haber realizado la dilución en cascada y quedando cada uno con la concentración planeada.

Para la incubación se usó cámara de anaerobiosis con monitor de H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Incubados a una temperatura de 35.5° ± 1°C con un tiempo de 72 horas, debido a su crecimiento lento, a una atmosfera de 5-10% CO<sub>2</sub>.(91, 92).

Se utilizaron tres placas de 96 pozos, la cuales contenían caldo+ extracto sin bacteria, esto con el fin de restar la densidad óptica (DO) que pudiera sesgar las mediciones con el lector de placas para ELISA y restarlas posteriormente a las mediciones obtenidas. Estas placas se realizaron de la misma manera (figura 19) que las anteriores y a las mismas concentraciones, al igual que se incubaron bajo las mismas condiciones.



**Figura 19.** Modelo para la resta de la densidad de extractos, CH: *C. hypoleucus* extracto de hexano, CAC: *C. hypoleucus* extracto de acetato de etilo, CM: *C. hypoleucus* extracto de metanol, CA: *C. hypoleucus* extracto acuoso, LM: *L. frutescens* extracto de metanol.

Las mediciones se obtuvieron utilizando un lector de placas para ELISA (absorbancia) a 600 nm directamente en la placa de 96 pozos después de 72 horas de incubación a una



































temperatura de 36.5°C. Una vez obtenidas las mediciones se hicieron ajustes en el experimento (fig. 16), como se describe a continuación:

1. Se ajustaron las concentraciones a utilizar las cuales fueron las siguientes; 2048 µg para el pozo que sirvió para realizar las diluciones seriadas, siendo la máxima concentración, posteriormente se utilizó 1024 µg, 512 µg, 256 µg, 128 µg. 64 µg y 32 µg, esto debido a que las concentraciones más bajas anteriormente utilizadas no presentaron ningún efecto.
2. Se aumentó la cantidad de bacteria a colocar en cada pozo, colocándose 100 µl de bacteria, debido a la falta de crecimiento bacteriano en los controles negativos. aumentándose de 10<sup>6</sup>/ml a 10<sup>7</sup>/ml.
3. Se Aumentó la Concentración de los Stocks, diluyendo en vez de 150 mg en 15 ml a 300 mg en 15 ml, con el fin de disminuir la cantidad de etanol en cada pozo con mayor concentración de extracto.
4. Se realizaron las diluciones para los controles positivos, los cuales fueron amoxicilina y metronidazol, las concentraciones empleadas fueron: 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml. Utilizando como disolvente para la amoxicilina Buffer de Fosfatos a 0.1 mol/L a pH 6 y para el metronidazol DMSO al 1%. Estos se almacenaron en crioviales estériles y a temperatura de 4°C hasta su utilización.

#### ***3.2.4. Evaluación de extractos crudos***

La colocación de los extractos se hizo mediante pipetas calibradas de 200 µl, 100 µl 50 µl y 10 µl múltiple, con puntas estériles en autoclave y corroborado con cinta testigo (figura 20).

-  Control negativo (caldo).
-  Control positivo (bacteria + caldo)
-  Pozos para dilución (caldo + 20.48 µl de extracto).
-  Diluciones seriales de extracto (µg/ml).
-  Control de amoxicilina (µg/ml).
-  Control de metronidazol (µg/ml).

	+	CH	CAC	CM	CA	LM	7	8	9	10	Am	Me
A												
B		1,024	1,024	1,024	1,024	1,024					16	16
C		512	512	512	512	512					8	8
D		256	256	256	256	256					4	4
E		128	128	128	128	128					2	2
F		64	64	64	64	64					1	1
G		32	32	32	32	32					0.5	0.5
H												

**Figura 20.** Modelo para la evaluación de extractos crudos. CH: *C. hypoleucus* extracto de hexano; CAC: *C. hypoleucus* extracto de acetato de etilo, CM: *C. hypoleucus* extracto de metanol; CA: *C. hypoleucus* acuoso; LM: *L. frutescens* extracto de metanol. Am: amoxicilina; Me: Metronidazol.

Se midió de la misma manera después de 72 horas, por absorbancia en lector de placas Elisa a 600 nm con filtro diferencial de 492 nm. Se utilizó parrilla de agitación para promover el crecimiento bacteriano.

### 3.2.5. Evaluación de compuestos puros

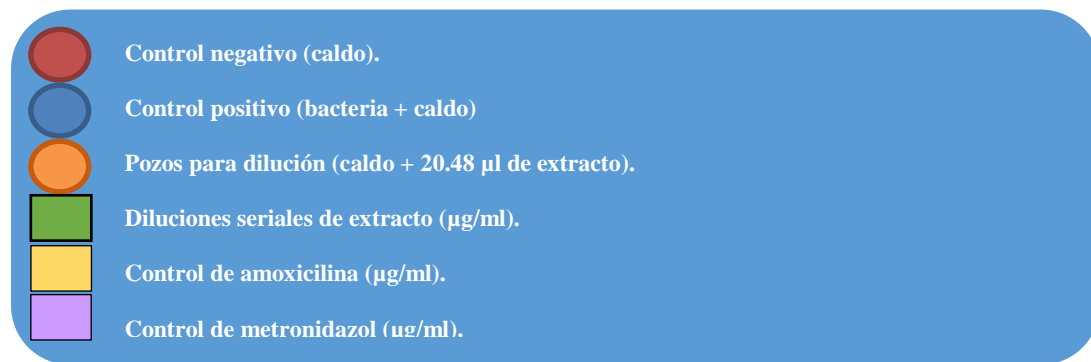
Se sometieron a evaluación antimicrobiana los compuestos aislados (labdano 1 y 3) del extracto de hexano de *Croton hypoleucus* (fracción F) y un acteosido aislado del extracto de metanol de *Leucophyllum frutescens* contra tres bacterias relacionadas a enfermedades del

periodonto (tabla 15); debido al mejor efecto mostrado en las pruebas anteriores; se evaluó por el mismo método (microdilución en caldo).

**Tabla 15.** Bacterias evaluadas en la segunda prueba microbiológica.

Bacterias evaluadas	ATCC
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>Nucleatum</i>	25586
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo a	43717

Para la segunda evaluación de los compuestos puros, se disminuyó la concentración utilizando las siguientes: 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml y 4 µg/ml (figura 21). Al igual se realizaron pruebas de solubilidad con Tween 20 y 40, DMSO, etanol y agua. Siendo el mejor disolvente agua.



	+	+	+	CH	CH	CH	Am	Am	Am	Me	Me	Me
<b>A</b>												
<b>B</b>				128	128	128	16	16	16	16	16	16
<b>C</b>				64	64	64	8	8	8	8	8	8
<b>D</b>				32	32	32	4	4	4	4	4	4
<b>E</b>				16	16	16	2	2	2	2	2	2
<b>F</b>				8	8	8	1	1	1	1	1	1
<b>G</b>				4	4	4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>H</b>												

**Figura 21.** Modelo para evaluación de extractos puros. CH: *C. hypoleucus* extracto de hexano; CAC: *C. hypoleucus* extracto de acetato de etilo, CM: *C. hypoleucus* extracto de metanol; CA: *C. hypoleucus* acuoso; LM: *L. frutenscens* extracto de metanol. Am: amoxicilina; Me: Metronidazol.

### **3.3. Análisis estadístico de datos**

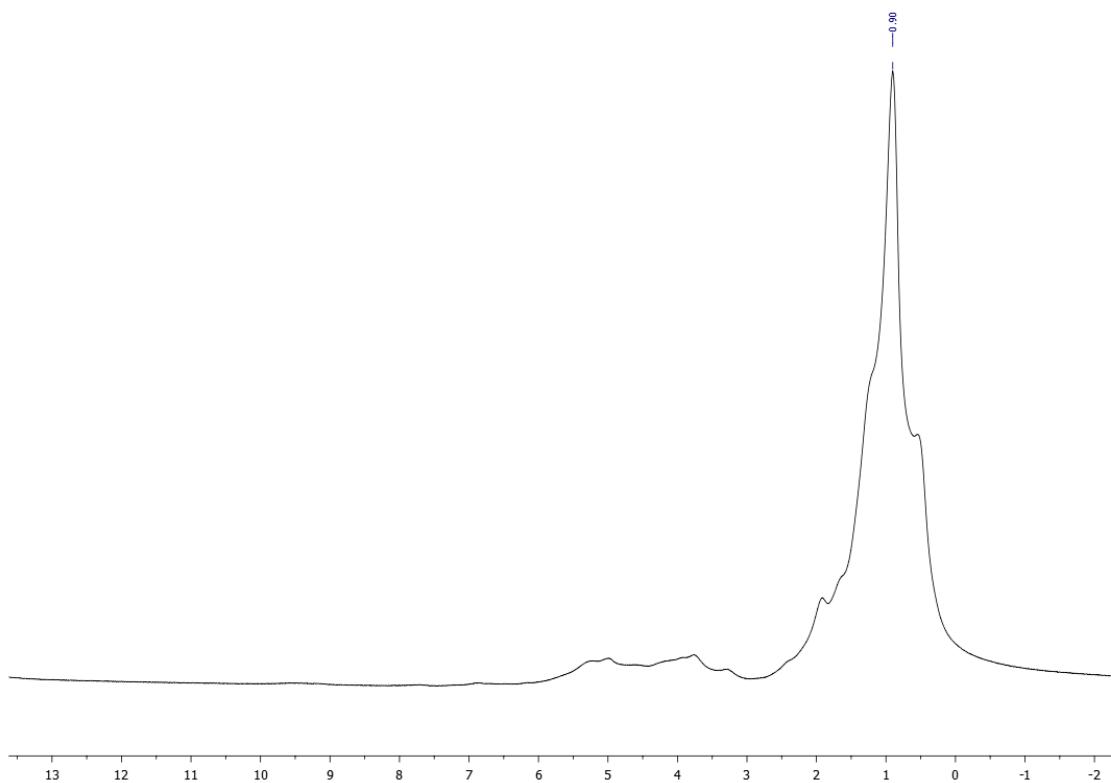
Los datos obtenidos de la lectura de la medición en el lector de placas para ELISA por absorbancia, se almacenaron en una base de datos en Excel versión 2010, se restó la densidad del extracto a las lecturas, y se convirtió los datos a número de bacterias/ml ( $\times 10^7$ /ml); para realizar la base a exportar y análisis de datos en SPSS versión 15, utilizando para el análisis una prueba paramétrica en este caso ANOVA de una vía (tabla 18), con una prueba post hoc de Tukey (tabla 19). Se comparó el control de máximo crecimiento bacteriano contra los resultados de cada concentración evaluada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Fitoquímica

#### 4.1.1. Caracterización e identificación de compuestos mayoritarios

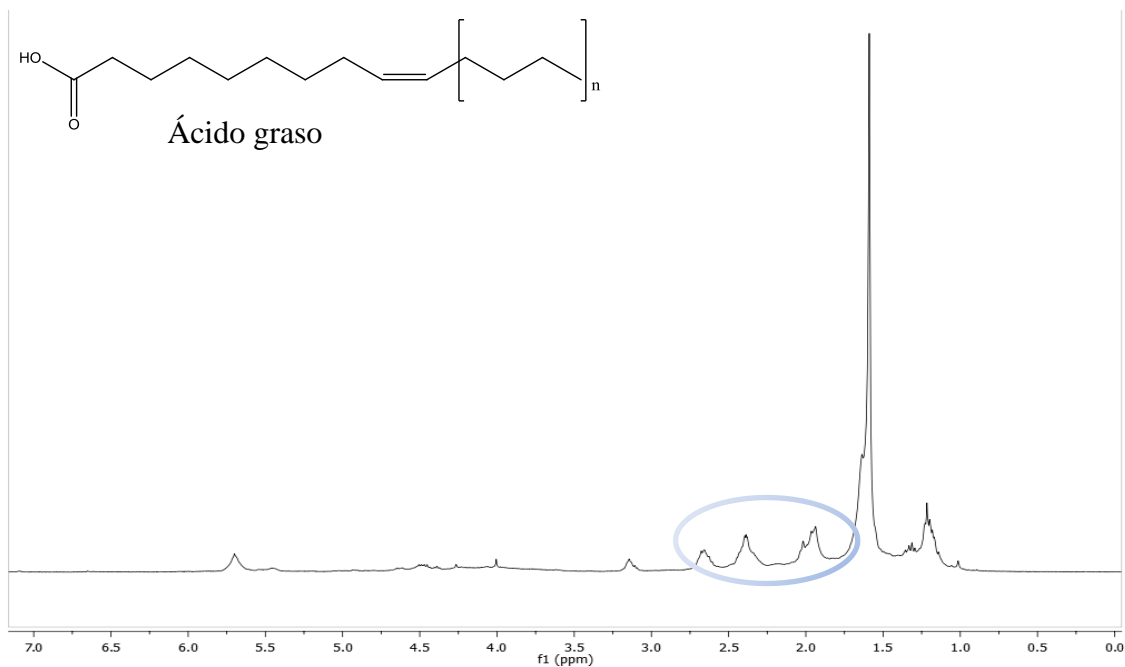
Debido a que el estudio fue biodirigido y en el ensayo previo se observó una mejor Actividad antimicrobiana del extracto de hexano, se procedió a la separación del extracto de *Croton hypoleucus*, a continuación se muestra la RMN de H<sup>1</sup> del extracto de hexano de *Croton hypoleucus* (figura 22).



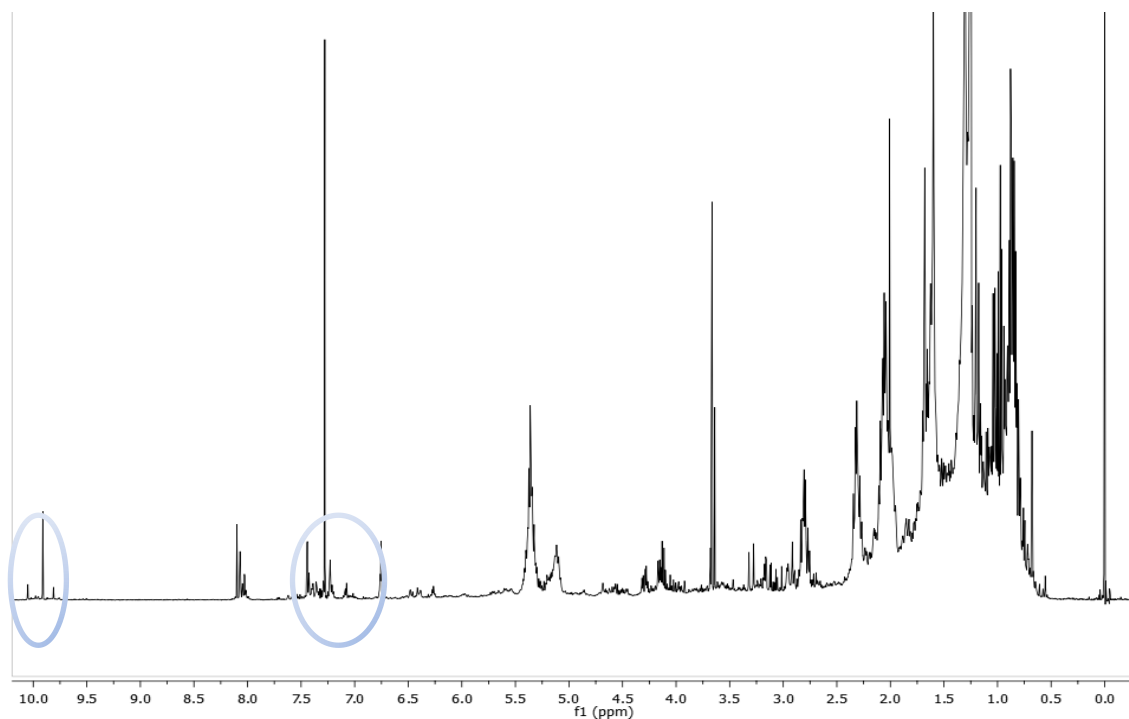
**Figura 22.** RMN de H<sup>1</sup> a 400 MHz del extracto crudo de hexano en CDCl<sub>3</sub>.

Se observó la presencia de ceras y ácidos grasos en la RMN (figura 22), Se procedió a la eliminación de ceras y grasas, por lo cual se colocó el extracto de Hexano 17 g en 500 ml de metanol a 40°C y enfriado a 0°C para después filtrarse, obteniéndose dos fases: una soluble y una insoluble, siendo la insoluble 10 g en la mayoría ácidos grasos y ceras, y la parte soluble 7 g.

Se envió a RMN de  $H^1$  la parte insoluble (figura 23), donde se observaron principalmente ceras y ácidos grasos. Al mismo tiempo envía a RMN  $H^1$ , la parte soluble en metanol (figura 24), donde se observaron señales características de un aldehído en 10 ppm y en 7.5 ppm características del anillo de furano características de los terpenos, en este caso labdanos y clerodanos.

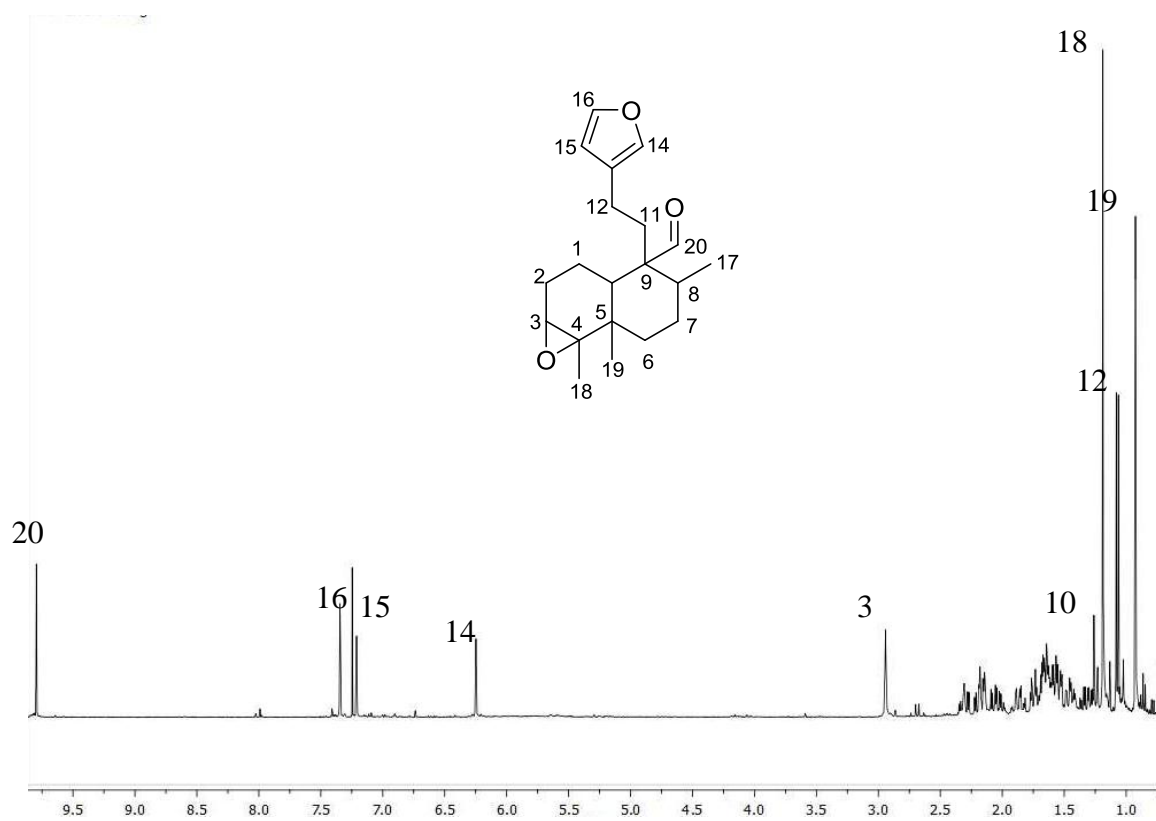


**Figura 23.** RMN de  $H^1$  a 400 MHz de la parte insoluble del proceso de eliminación de grasas y ceras en  $CDCl_3$ .

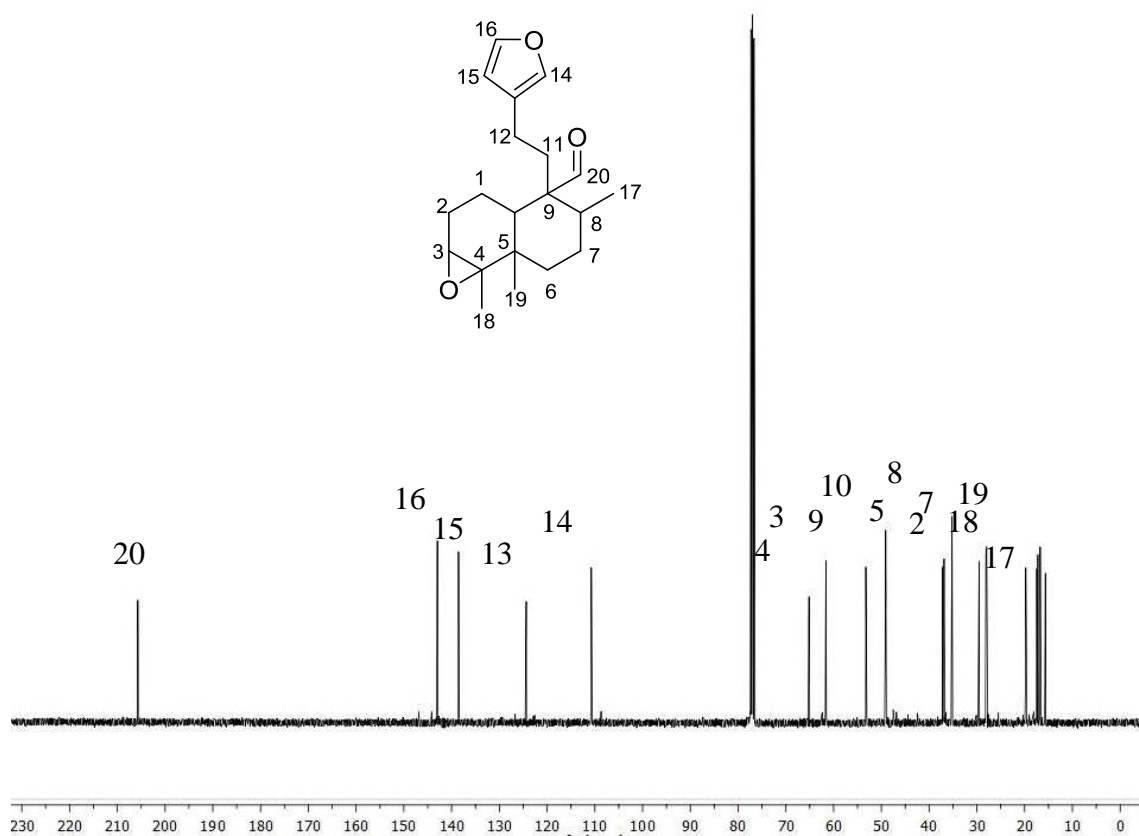


**Figura 24.** RMN de  $H^1$  a 400 MHz en  $CDCl_3$  de la parte soluble del extracto de hexano.

#### 4.1.1.1. Fracción D



**Figura 25.** RMN de  $H^1$  a 400 MHz en  $CDCl_3$  del labdano 2.



**Figura 26.** RMN de  $\text{C}^{13}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del labdano 2.



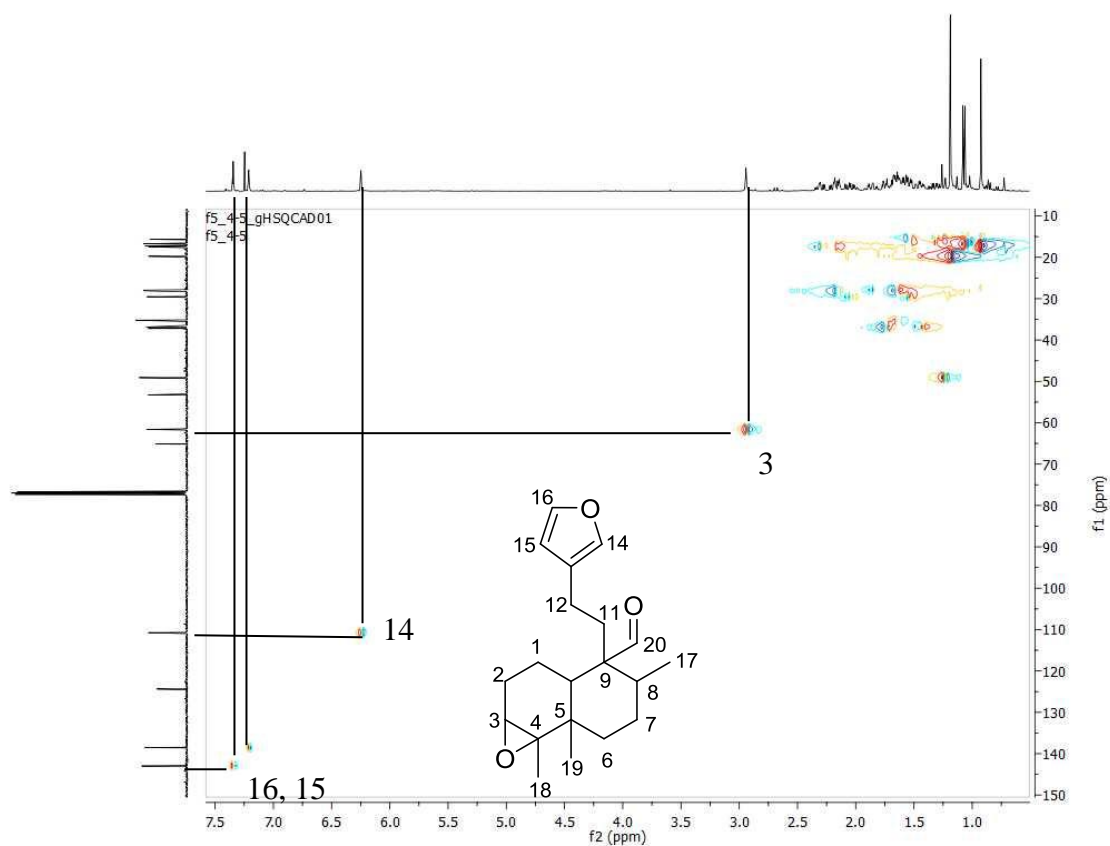
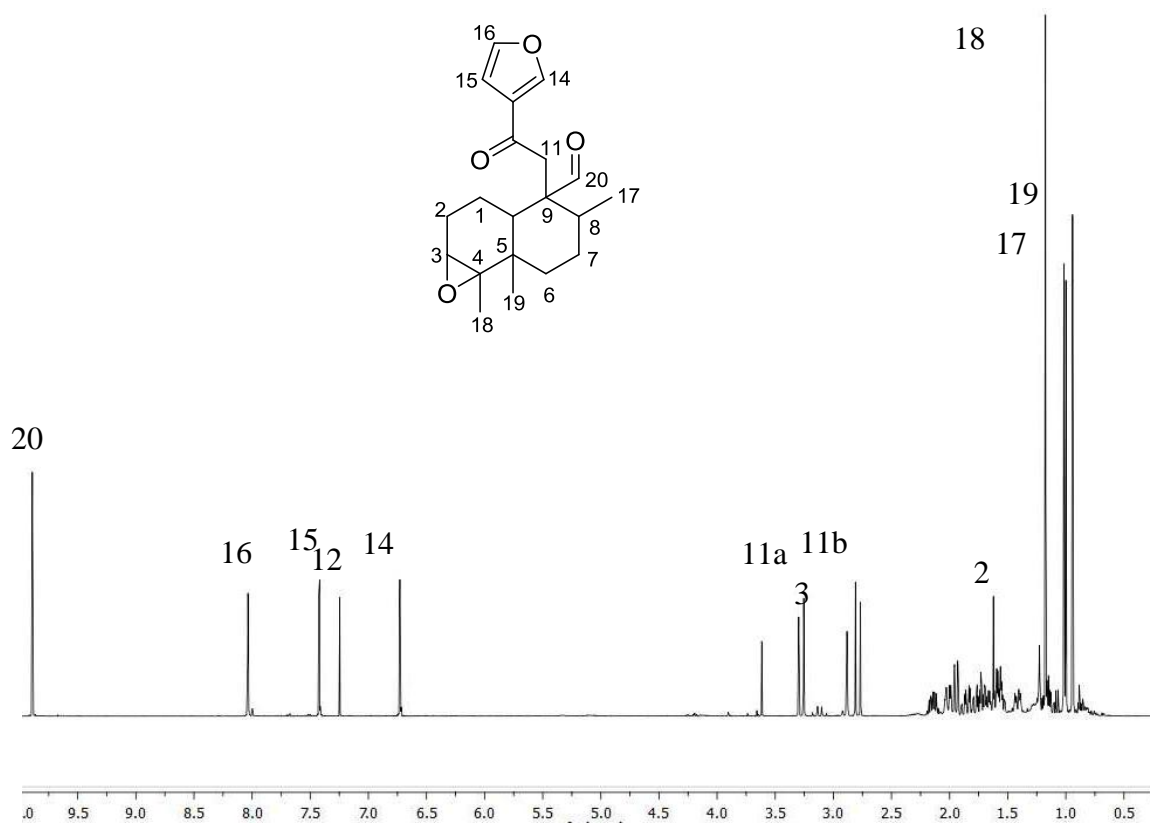


Figura 27. HSQC del labdano 2.

#### 4.1.1.2. Fracción F: labdano 1

Se obtuvo el siguiente terpeno el cual se identificó por RMN de  $H^1$  (Fig. 43) y de  $C^{13}$  (Fig. 44), además HSQC (Fig. 45), se muestran a continuación.



**Figura 28.** RMN H<sup>1</sup> a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> del labdano 1.

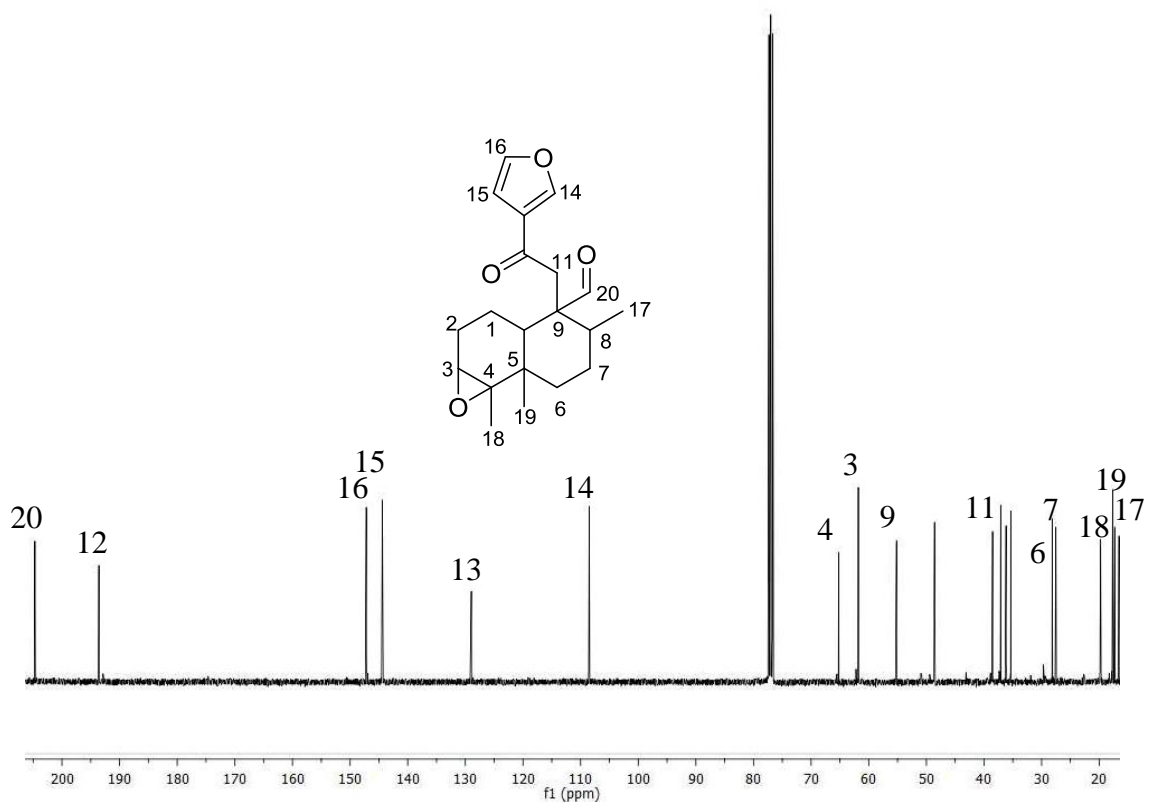


Figura 29. RMN de  $C^{13}$  a 100 MHz en  $CDCl_3$  del labdano 1.

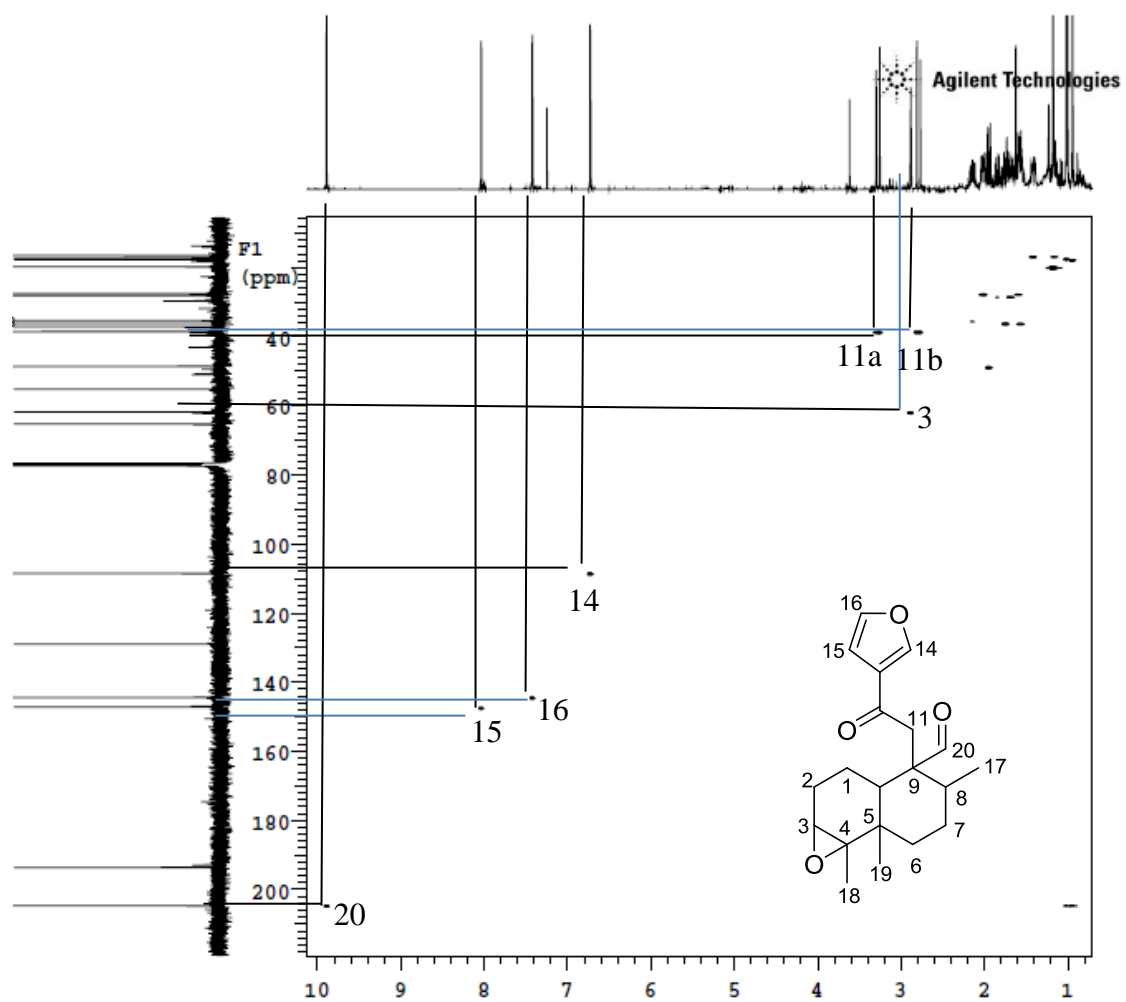


Figura 30. HSQC del labdano 1.

### 4.1.1.3. Fracción F: labdano 3

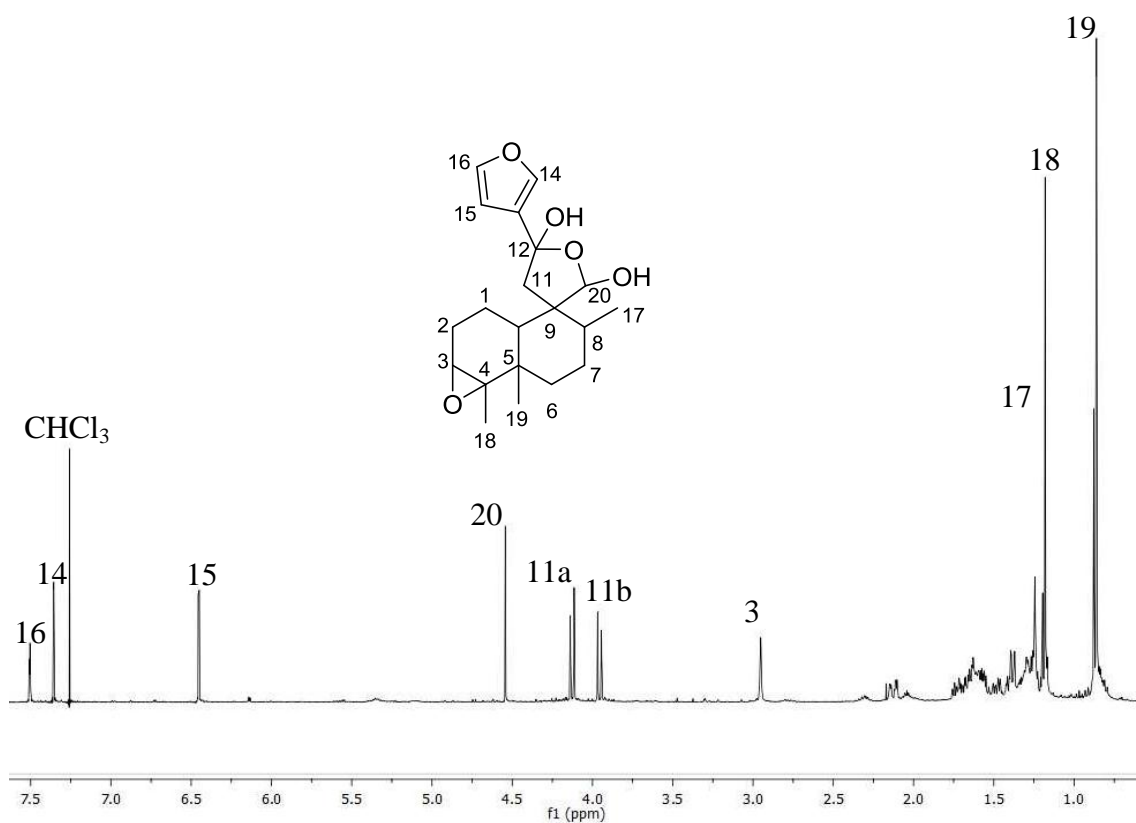


Figura 31. RMN de H<sup>1</sup> a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> del labdano 3.

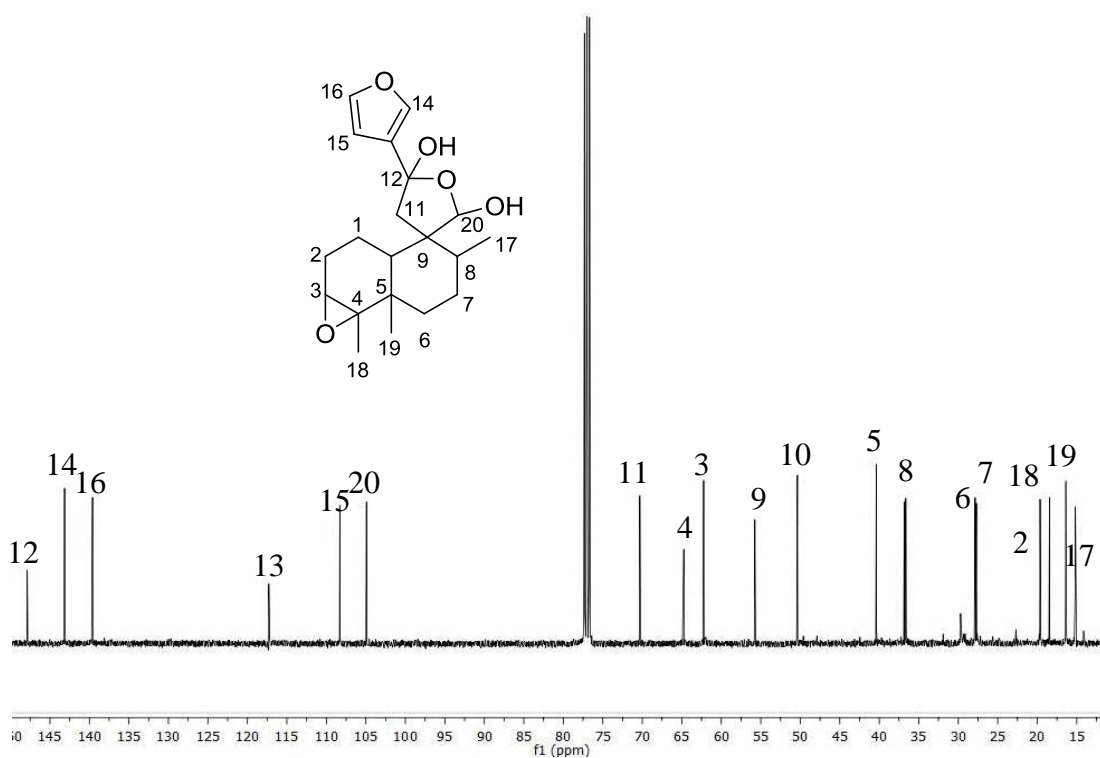


Figura 32. RMN de  $C^{13}$  en  $CDCl_3$  del labdano 3.

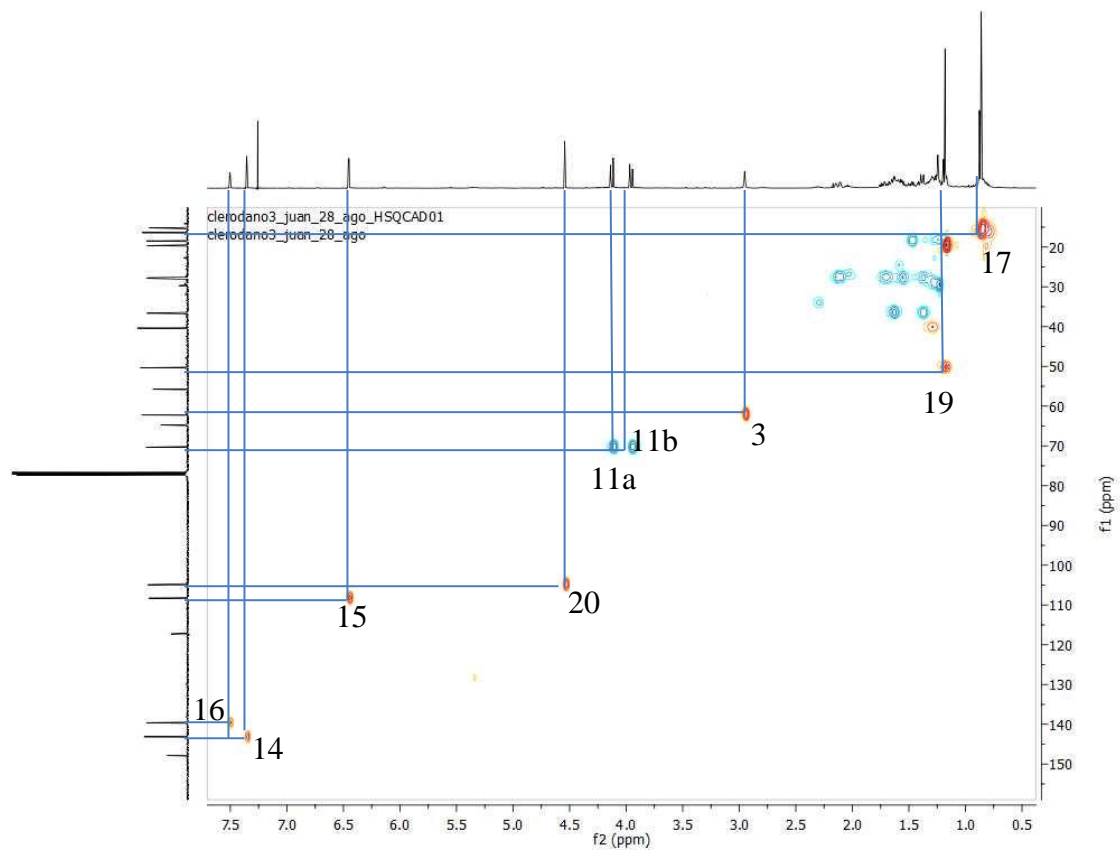


Figura 33. HSQC del labdano 3.

#### 4.1.1.4. Extracto de metanol de *Leucophyllum frutescens*

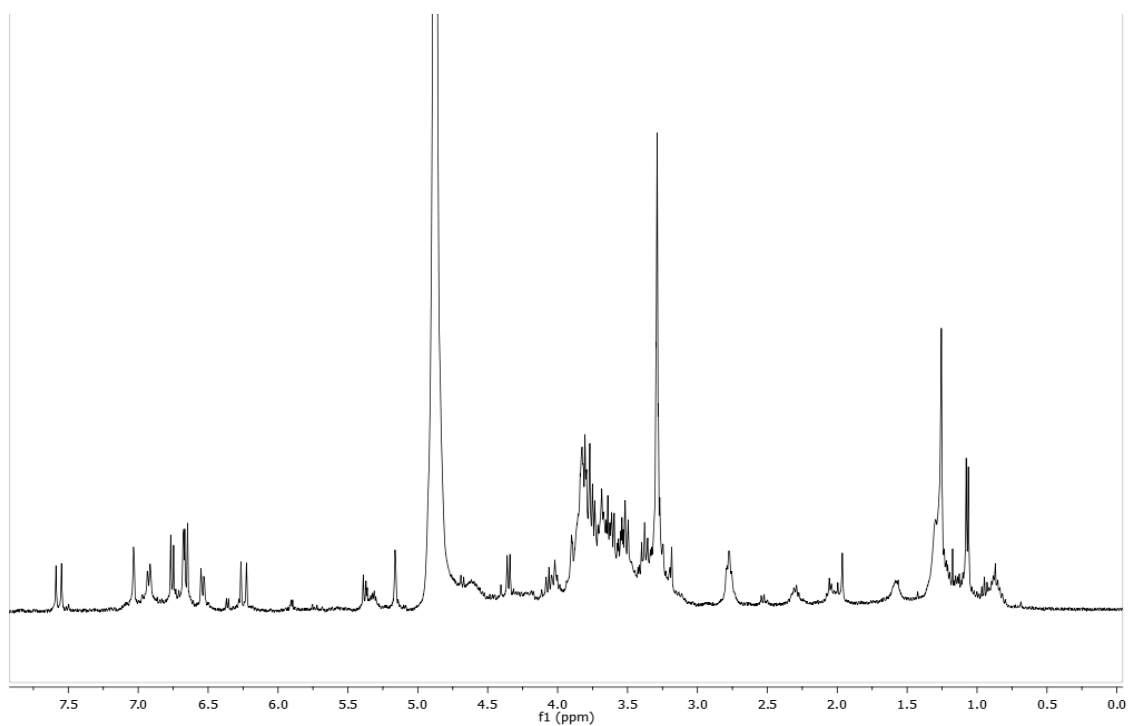


Figura 34. Parte soluble del extracto de metanol.

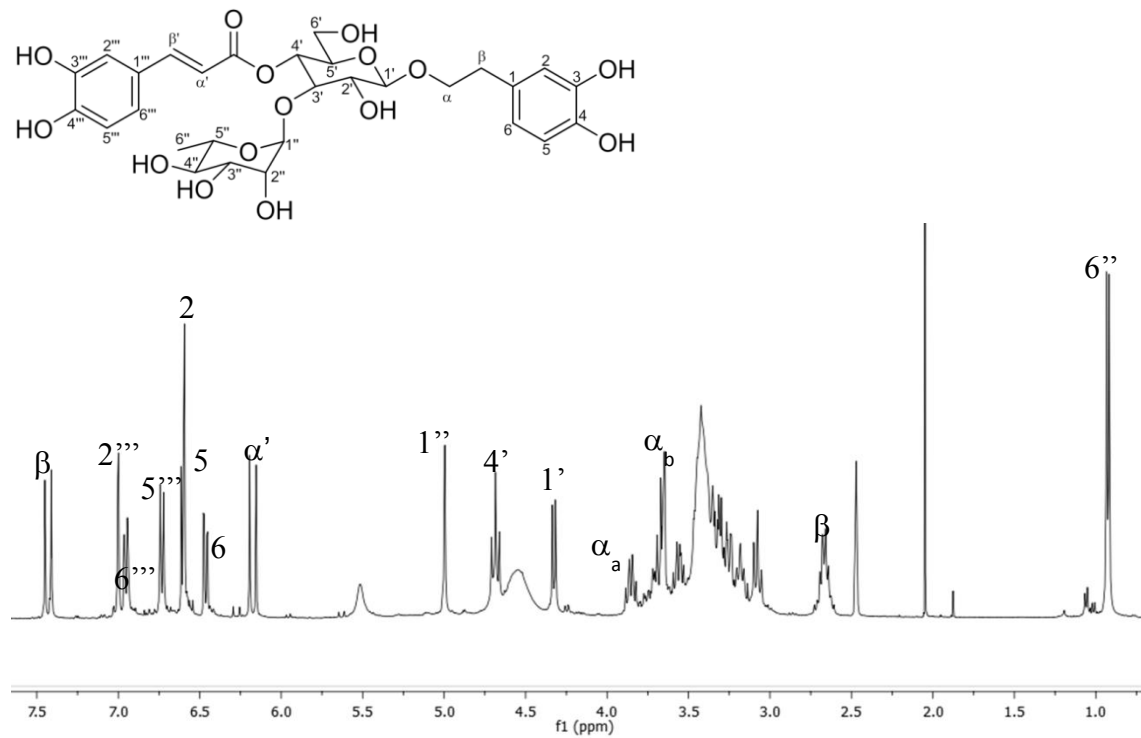


Figura 35. RMN de  $H^1$  a 400 MHz del acteosido.

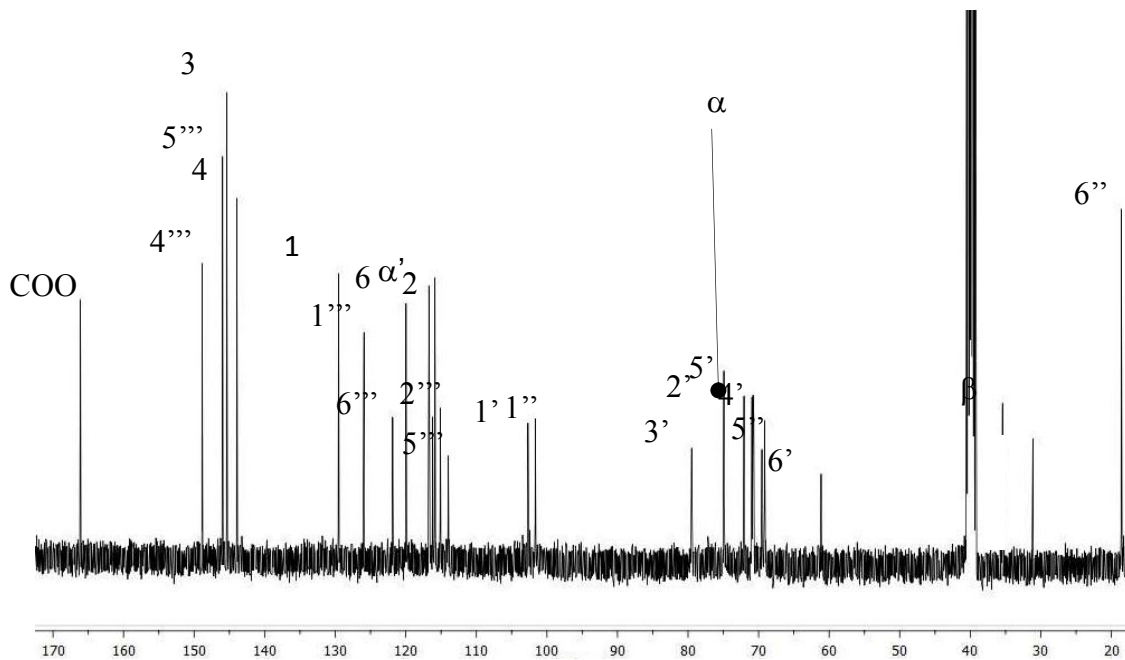


Figura 36. RMN de  $C^{13}$  a 100 MHz del acteosido.

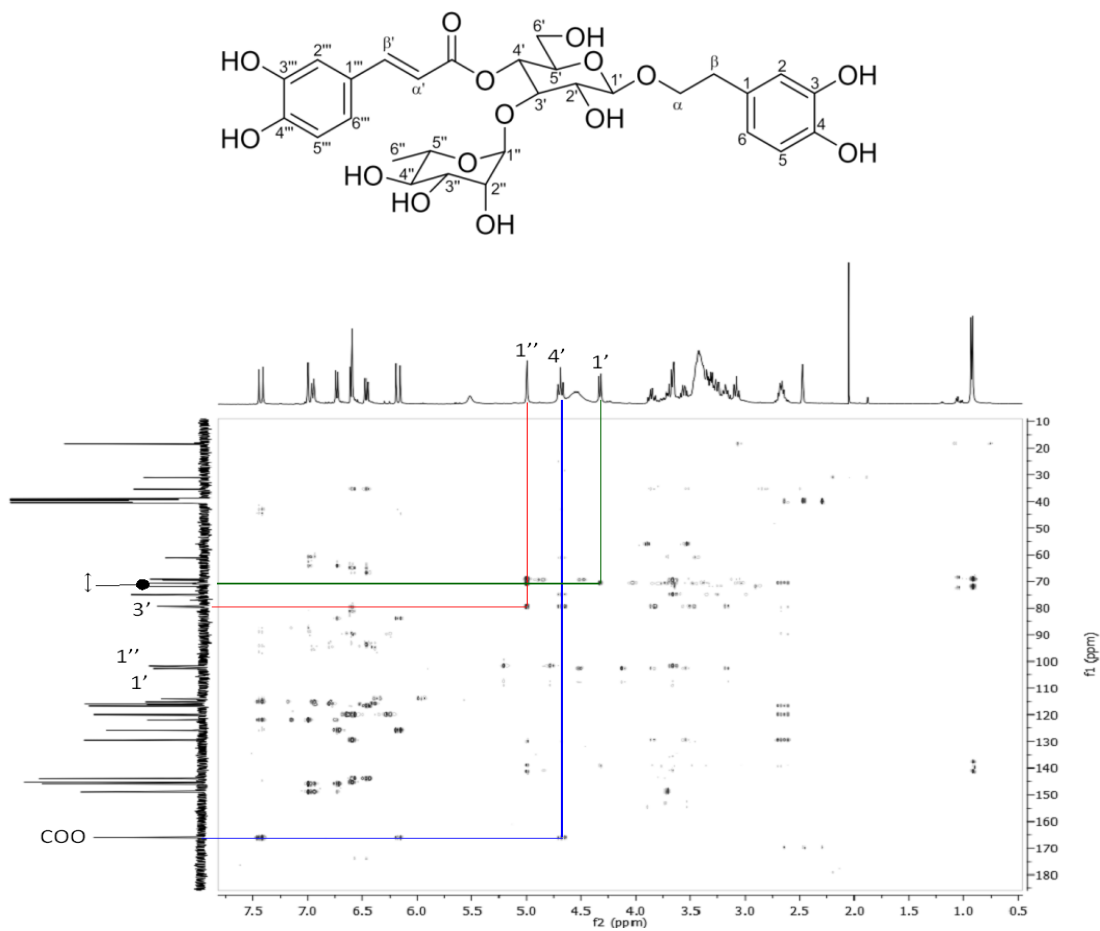
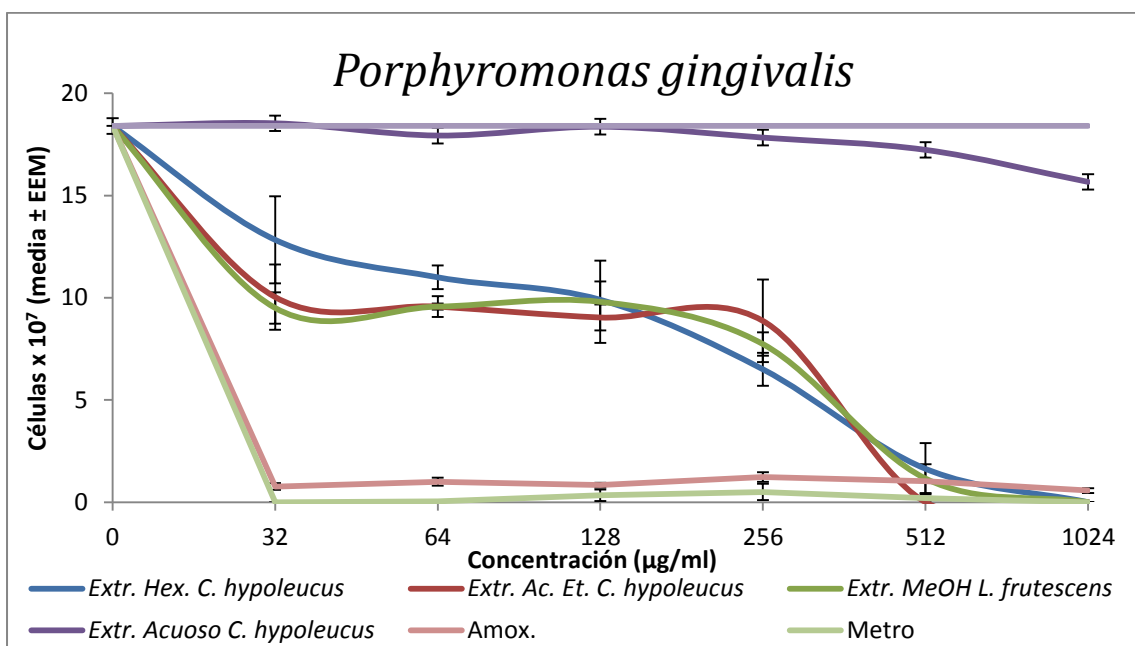


Figura 37. HMBC de dos y tres enlaces.

## 4.2. Microbiología (determinación de actividad antibacteriana)

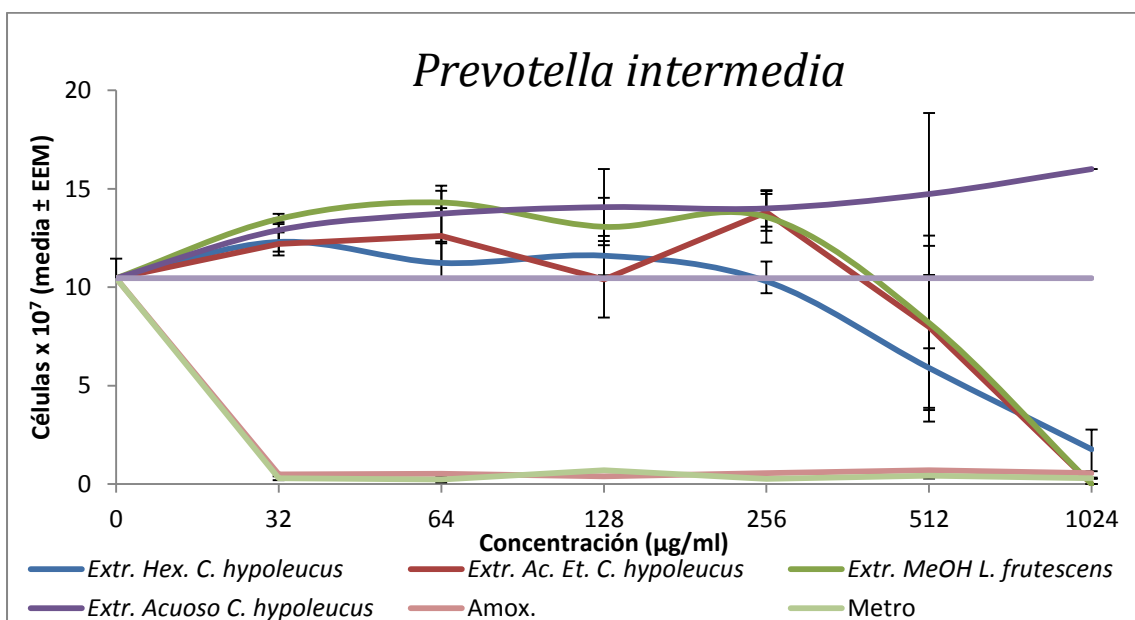
### 4.2.1. Evaluación de extractos crudos

Los resultados de las 10 bacterias evaluadas muestran la inhibición bacteriana en relación del número de células (y) a las distintas concentraciones(x) después de 72 horas de incubación:



**Figura 38.** Evaluación de los extractos crudos frente a *P. gingivalis*, los controles positivos fueron evaluados a una concentración de .5-32 µg/ml en todas las bacterias.

**Figura 39.** Evaluación extractos crudos contra *P. intermedia*.





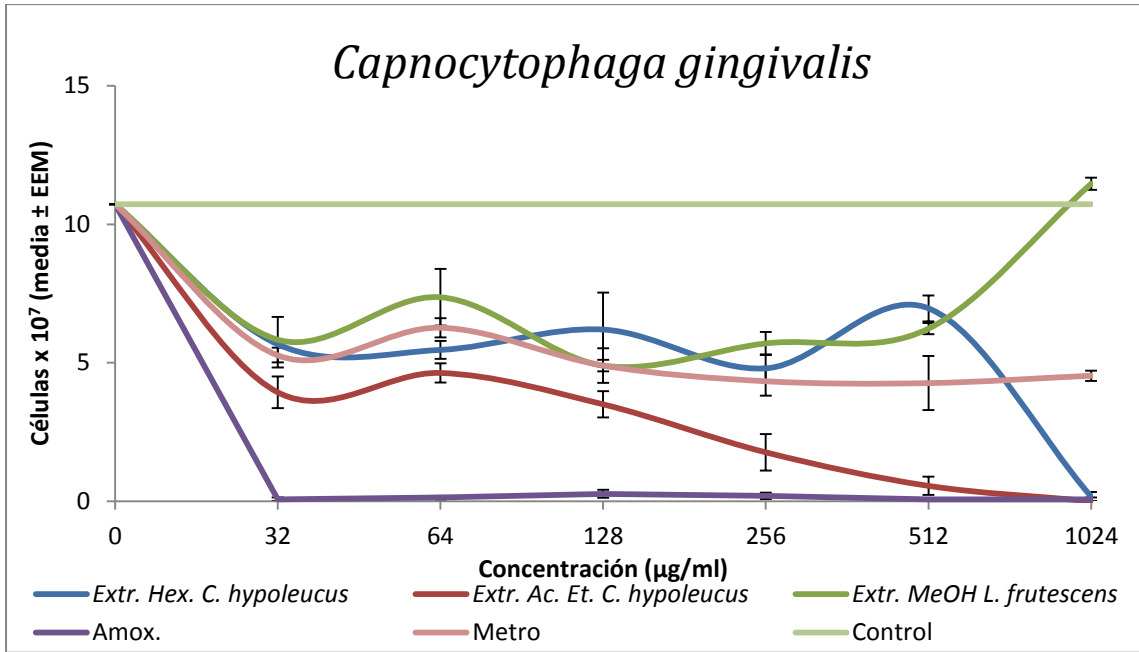


Figura 40. Evaluación extractos crudos contra *C. gingivalis*.

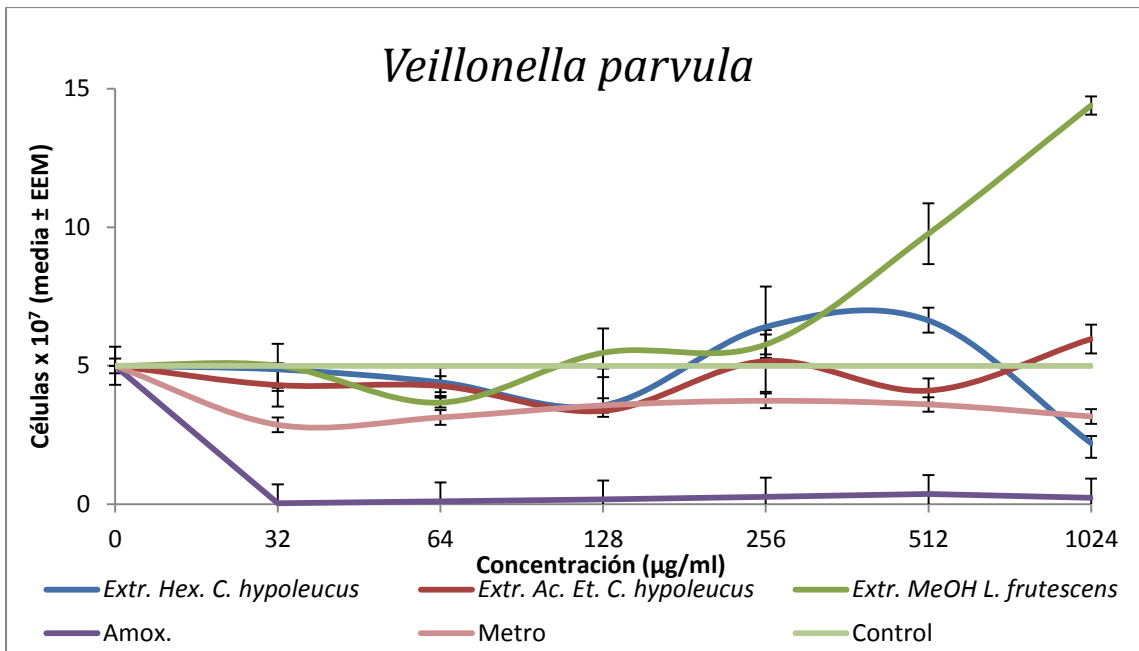


Figura 41. Evaluación extractos crudos contra *V. parvula*.

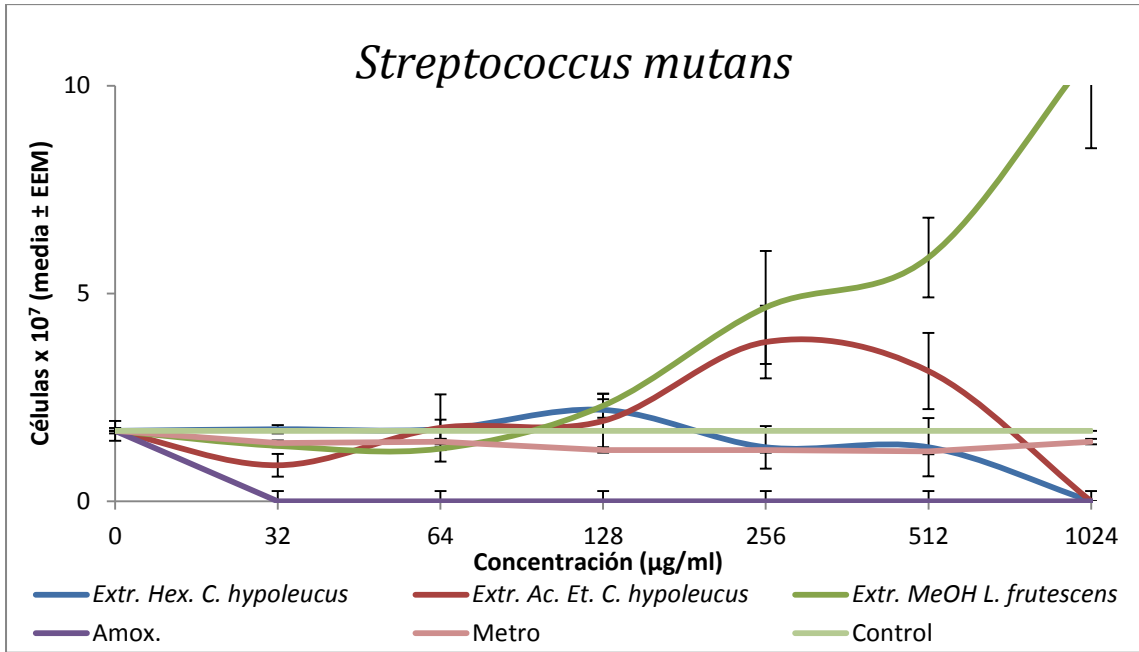


Figura 42. Evaluación extractos crudos contra *S. mutans*.

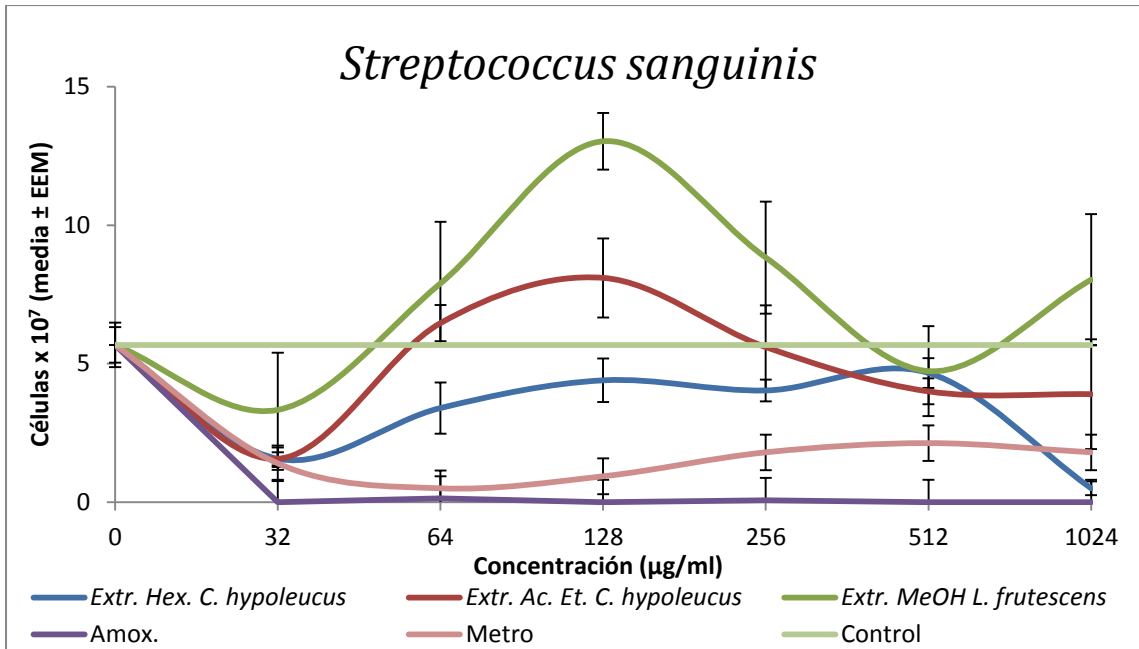


Figura 43. Evaluación extractos crudos contra *S. sanguinis*

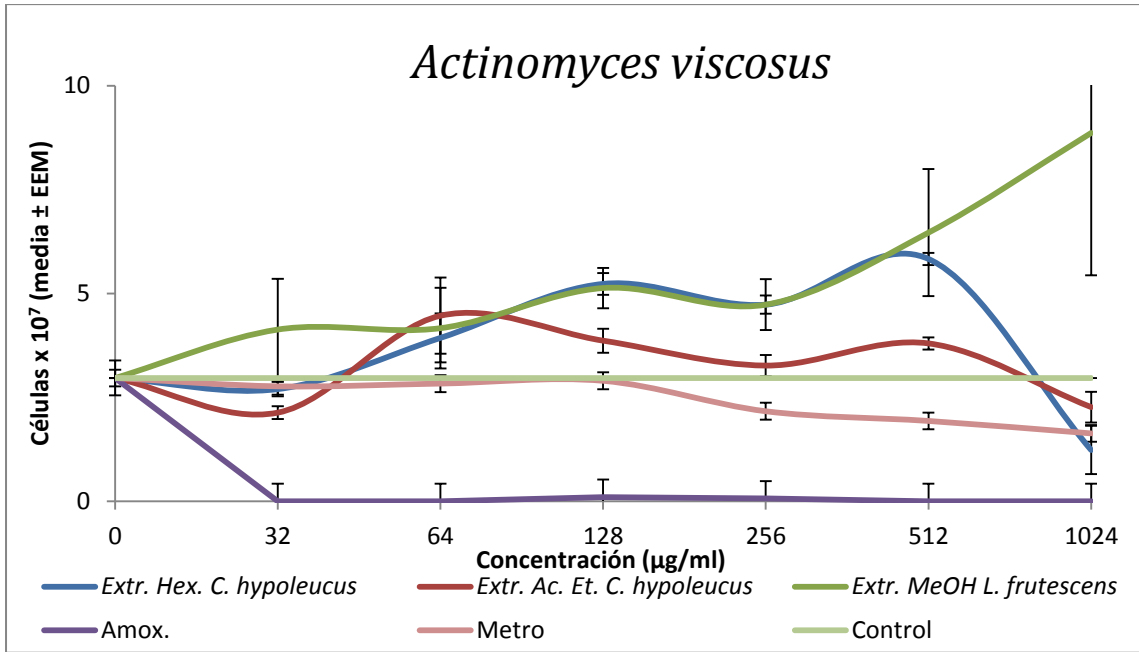


Figura 44. evaluación extractos crudos contra *A. viscosus*.

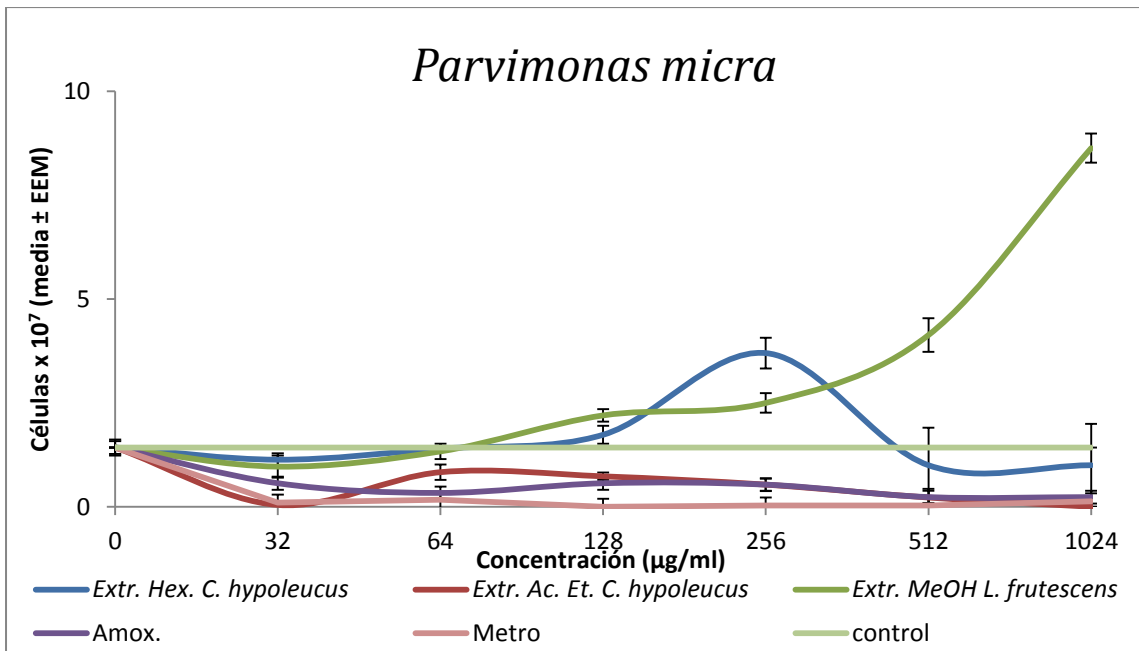


Figura 45. Evaluación extractos crudos contra *P. micra*

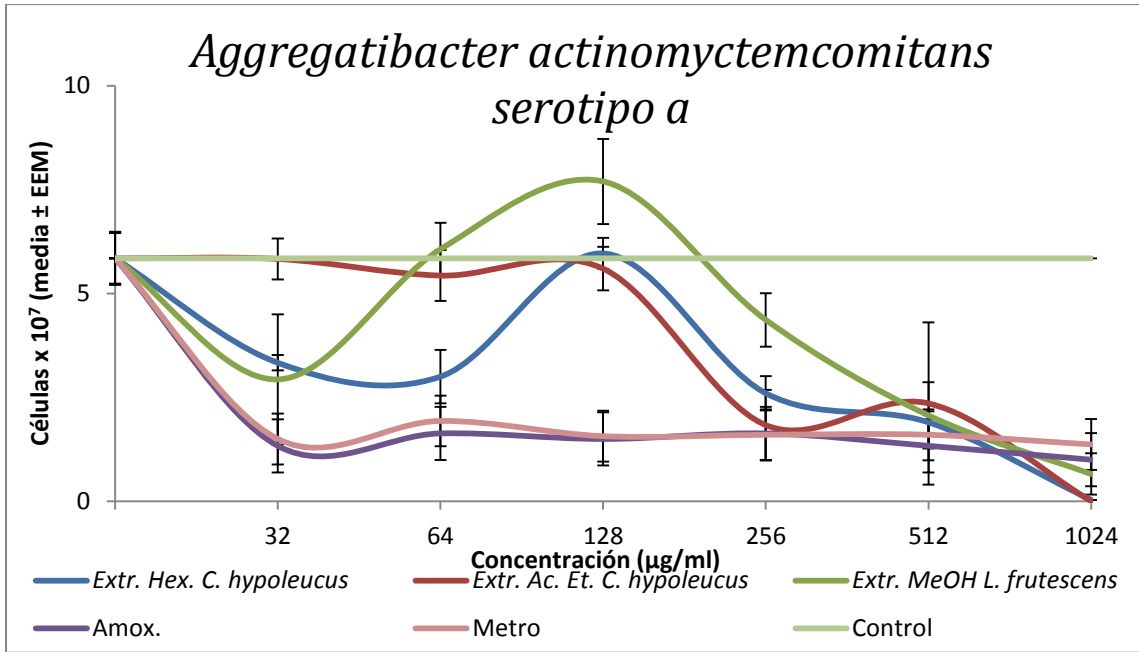


Figura 46. Evaluación extractos crudos contra *A. a. a*

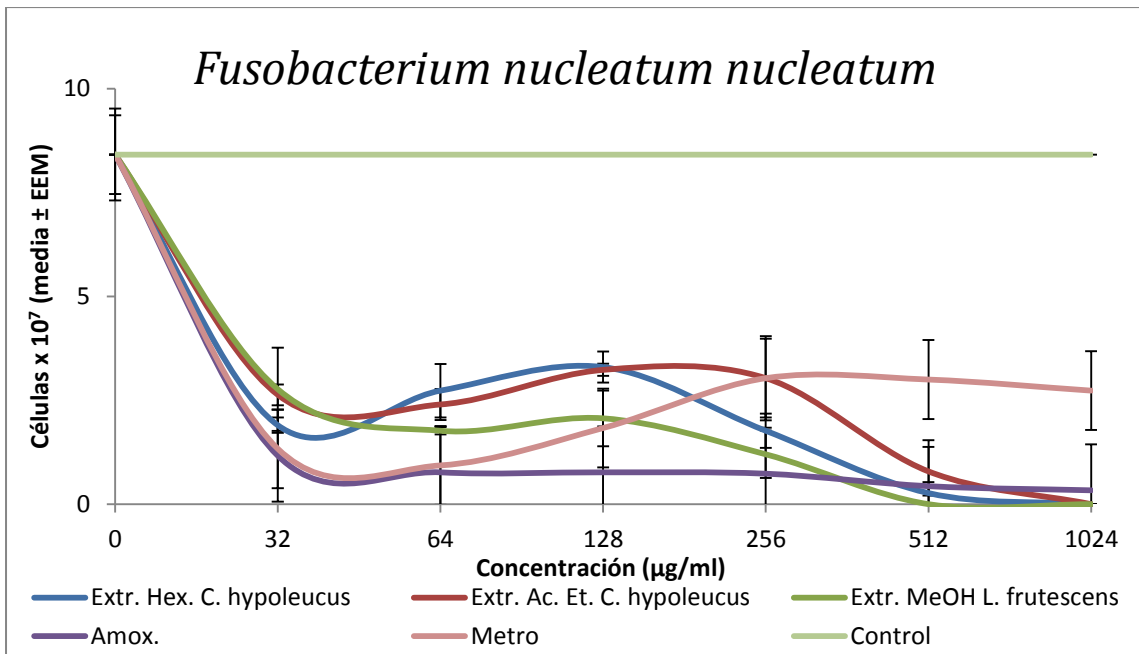


Figura 47. Evaluación extractos crudos contra *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*

A continuación se muestra la CI<sub>50</sub> (tabla 10) y la actividad antibacteriana; el mejor efecto fue para el extracto de Hexano de *C. hypoleucus* y Metanol de *L. frutescens*, seguido por el extracto de acetato de etilo de *C. hypoleucus*. Siendo la CI<sub>50</sub> la siguiente:

**Tabla 16.** CI<sub>50</sub> en µg/ml de las bacterias evaluadas contra los extractos crudos. N/e= no evaluado.

<b>CI<sub>50</sub> µg/ml de las bacterias evaluadas contra los extractos crudos</b>					
<b>Bacterias</b>	<b>Amox</b>	<b>MeOH <i>Leucophyllum</i></b>	<b>EtoAC <i>Croton</i></b>	<b>Hex <i>Crot</i></b>	<b>Acuoso <i>Crot</i></b>
<i>P. gingivalis</i>	15	195	173	<b><u>105</u></b>	1541128
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>Nucleatum</i>	1	99	99.4	<b><u>94</u></b>	N/e
<i>P. intermedia</i>	12	657	650	<b><u>501</u></b>	10477 <sup>42</sup>
<i>A. actinomycetemcomitans</i> stp. <i>a</i>	15	<b><u>30.5</u></b>	306	93	N/e
<i>P. micra</i>	20	Np	560	<b><u>551</u></b>	N/e
<i>S. mutans</i>	13	601	848	<b><u>520</u></b>	N/e
<i>S. sanguinis</i>	13	688	111	<b><u>56</u></b>	N/e
<i>A. Viscosus</i>	13	1024	1459	<b><u>986</u></b>	N/e
<i>V. parvula</i>	15	Np	6.1073 <sup>17</sup>	<b><u>651</u></b>	N/e
<i>C. gingivalis</i>	13	112	<b><u>32</u></b>	79	N/e

En las gráficas mostradas anteriormente, se observa el número de células presentes a diferentes concentraciones de acuerdo a la absorbancia, observamos un comportamiento no lineal, principalmente a bajas dosis, esto ya descrito en la literatura donde se da un comportamiento estimulante a bajas dosis por algunos microorganismos a manera de compensar el daño ocasionado, pero que sin embargo no es suficiente para eliminar la bacteria. Este fenómeno se denomina 'hormesis'.

**Tabla 17.** CMI en µg/ml de los extractos crudos evaluados con sus controles; Np=no presente, N/e= no evaluado.

CMI en µg/ml	Amox	MeOH <i>Leuco</i>	EtoAC <i>Crot</i>	Hex <i>Crot</i>	Acuoso <i>Crot</i>
<i>P. gingivalis</i>	32	1024	1024	<b><u>1024</u></b>	Np
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	32	<b>512</b>	1024	<b><u>512</u></b>	N/e
<i>P. intermedia</i>	0.5	>1024	<b><u>1024</u></b>	Np	Np
<i>A. actinomycetemcomitans</i> a	32	>1024	<b><u>1024</u></b>	<b><u>1024</u></b>	N/e
<i>P. micra</i>	32	>1024	>1024	>1024	N/e
<i>S. mutans</i>	0.5	>1024	>1024	<b><u>1024</u></b>	N/
<i>S. sanguinis</i>	0.5	>1024	>1024	<b><u>1024</u></b>	
<i>A. Viscosus</i>	0.5	>1024	>1024	>1024	N/e
<i>V. parvula</i>	0.5	>1024	>1024	>1024	N/e
<i>C. gingivalis</i>	0.5	>1024	<b><u>1024</u></b>	<b><u>1024</u></b>	N/e

Variable dependiente: Número de células bacterianas

De acuerdo a los valores de la CMI se observa un mejor comportamiento del extracto de Hexano (tabla 17,18 y 19), pudiéndose determinar la CMI en 7 de 10 bacterias, seguido por el extracto de Acetato de etilo y en tercer lugar el extracto de Metanol de *L. frutescens*.

#### 4.2.2 Resultados estadísticos de los extractos crudos

Los resultados para todas las bacterias evaluadas la significancia fue:

**Tabla 18.** Significancia de las 10 bacterias evaluadas.

<i>Variable</i>	<i>Significación</i>
Concentración	0.001
Extracto	0.001

**Tabla 19.** Subconjuntos Homogéneos para extractos y concentración

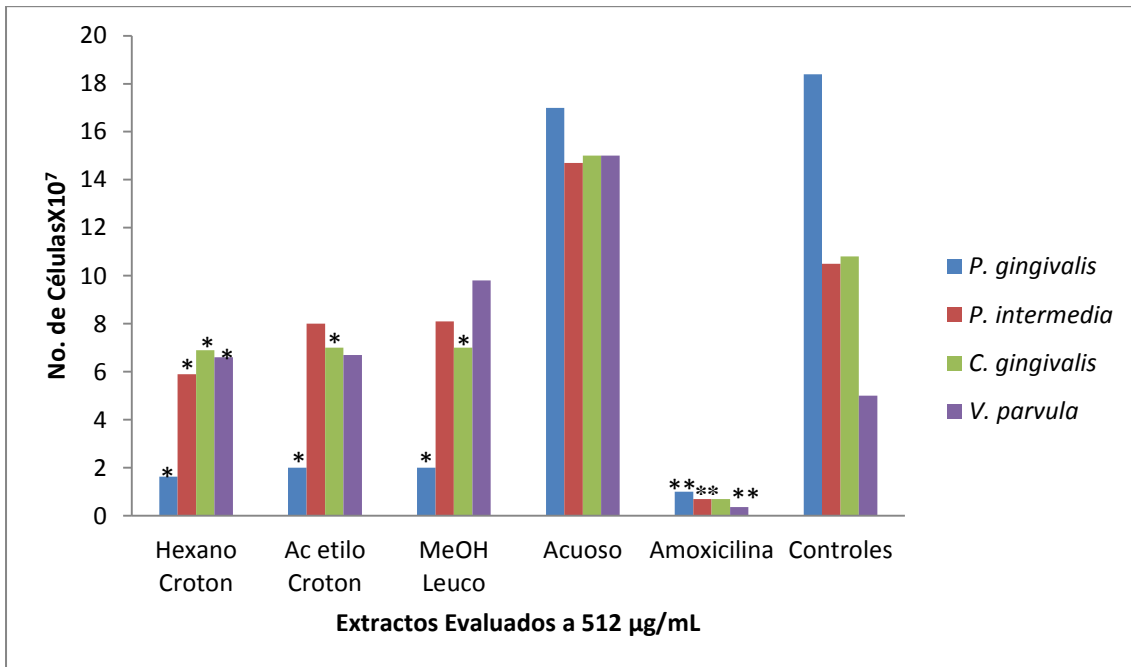
<b>Extracto</b>	<i>P. g.</i>	<i>P. i.</i>	<i>C. g.</i>	<i>V. p.</i>	<i>S. m.</i>	<i>S. s.</i>	<i>P. m.</i>	<i>A. v.</i>	<i>F. n. n.</i>	<i>A. a. a</i>
Hexano <i>C. hypoleucus</i>	B	B	C	B	B	B	B	C	B, C	B
Ac. Etilo <i>C. hypoleucus</i>	B	B	B	C	B	C	A	C	B, C	C
MeOH <i>L. frutescens.</i>	B	B, C	D	D	C	D	C	D	A, B	C
Acuoso <i>C. hypoleucus</i>	C	C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Metronidazol	A	A	C	B	B	A, B	A	B	C	A
Amoxicilina	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Concentración										
1024 µg/ml	A	A	A	B	C	A, B	D	A	A	A
512 µg/ml	A	A, B	A	A, B	B, C	A, B	C, D	A	A, B	A, B
256 µg/ml	B	B, C	A	A, B	A, B, C	B, C	A, B	A	C	B, C
128 µg/ml	B	B, C	A, B	A	A, B	C	A, B	A	C	D
64 µg/ml	B	B, C	A, B	A	A, B	B, C	A	A	B, C	C, D
32 µg/ml	B	B, C	A, B	A	A	A	A	A	C	B, C
0 µg/ml	C	C	C	B	A, B, C	C	B, C	A	D	E

Grupos con la misma letra=Grupos semejantes. En orden de significancia A es el de mayor significancia, seguido de B y así sucesivamente con C y el de menor significancia es D. *P. g.*= *Porphyromonas gingivalis*, *P. i.*= *Prevotella intermedia*, *C. g.*= *Capnocytophaga gingivalis*, *V. p.*= *Veillonella parvula*, *S. m.*= *Streptococcus mutans*, *S. s.*= *Streptococcus sanguinis*, *P. m.*= *Parvimonas micra*, *A. v.*= *Actinomyces viscosus*, *F. n. n.*= *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *A. a. a*= *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a.

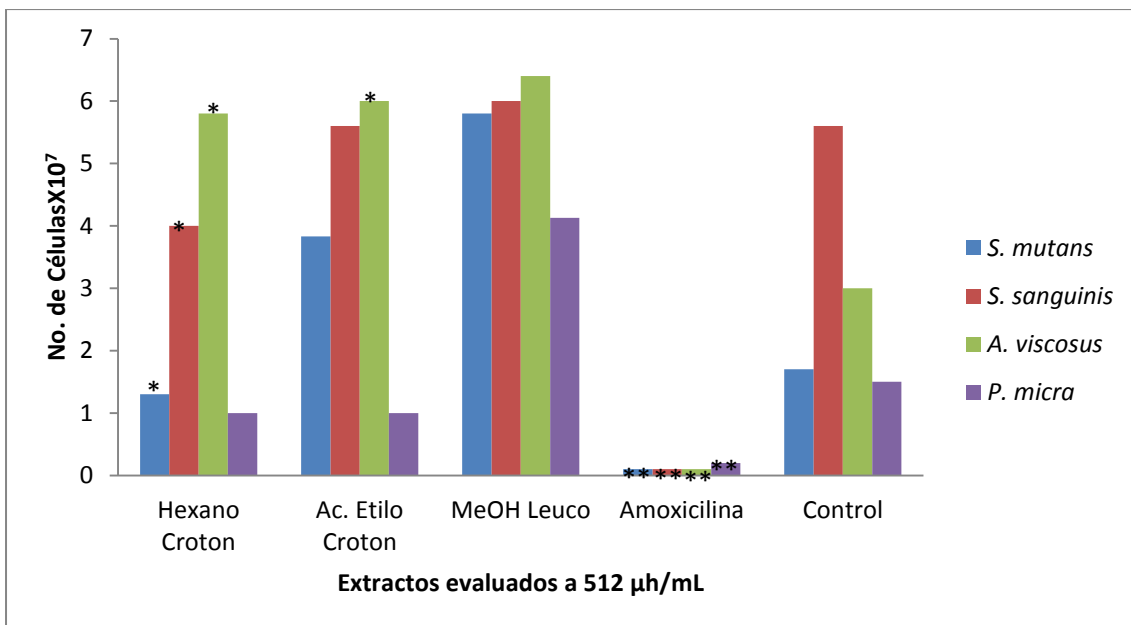
En el análisis estadístico se corrobora que los pozos con mayor inhibición fueron los controles positivos, seguido por el extracto de Hexano de *C. hypoleucus* como el extracto con mejor comportamiento y mayor significancia. En la tabla 18 se muestra una significancia menor al 0.05, se comparó el pozo de control de máximo crecimiento bacteriano contra cada uno de los extractos evaluados. Para saber dónde se encuentran las diferencias se aplicó a la ANOVA un prueba post hoc de Tukey; la cual se representa en la segunda tabla (19), denominada de subconjuntos homogéneos, ubicados en la parte izquierda las variables independientes, en este caso concentración y extracto, observamos que los controles positivos Amoxicilina y metronidazol fueron los conjuntos con mayor significancia y por lo tanto mejor efecto; seguido por el grupo del extracto de Hexano de *C. hypoleucus*, con menor significancia

el grupo de acetato de etilo de *C. hypoleucus* y en tercer sitio al extracto de metanol de *L. frutescens*.

La tabla 19 también muestra las concentraciones con mejor efecto inhibitorio, las cuales fueron a 1,024 y 512 µg/ml. Los resultados de la primera evaluación antimicrobiana, mostraron al extracto de hexano de *C. hypoleucus* como el más bioactivo (figura 48,49 y 50).

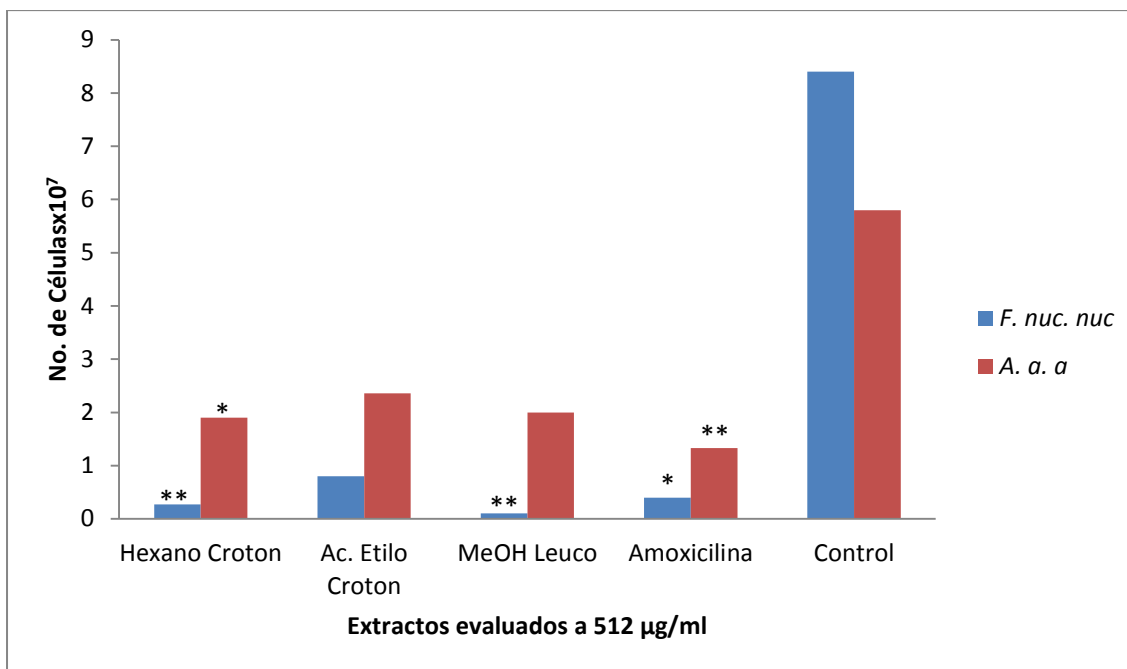


**Figura 48.** Desempeño de las bacterias evaluadas a 512 µg/ml contra los extractos crudos.



**Figura 49.** Desempeño de las bacterias evaluadas a 512 µg/ml contra los extractos crudos.





**Figura 50.** Desempeño de las bacterias evaluadas a 512 µg/ml contra los extractos crudos.

De acuerdo a lo observado en el comportamiento a las diferentes dosis evaluadas en las distintas bacterias, el extracto de Hexano de *C. hypoleucus* presentó un efecto más bajo en las CI<sub>50</sub> y CMI respecto al extracto de acetato de etilo y de metanol de *L. frutescens*. En la figura 48, 49 y 50, observamos el desempeño del extracto de hexano de *C. hypoleucus* en comparación con el extracto de acetato de etilo y de metanol de *Leucophyllum*; donde el extracto de hexano de *Croton* frente a *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. sanguinis*, *S. mutans*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* stp. a presentó un mejor efecto inhibitorio a comparación con el extracto de acetato de etilo el cual solo tuvo mejor desempeño en *C. gingivalis*, *V. parvula*, *A. viscosus* y *P. micra* a 256 µg/ml.

Las CMI de los extractos de Hexano, acetato de etilo de *C. hypoleucus* y el de Metanol de *L. frutescens* además del control positivo que fue amoxicilina. Observando que el extracto de Hexano de *C. hypoleucus* alcanza la CMI en 7 de las 10 bacterias evaluadas, las cuales fueron: *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* stp. a, *S. mutans*, *S. sanguinis* y *C. gingivalis*; en comparación con el extracto de acetato de etilo el cual alcanza la CMI en 5 de las 10 bacterias evaluadas, las cuales fueron: *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a y *C. gingivalis*, siendo más alta la CMI la concentración para conseguir la inhibición en el extracto

de metanol de *L. frutescens* para el extracto de hexano de *C. hypoleucus* en *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*. El acuoso en las dos bacterias evaluadas no tuvo algún efecto inhibitorio.

El extracto de Metanol de *L. frutescens* alcanzo la CMI solo en *P. gingivalis* y *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*.

Las CI<sub>50</sub> de los extractos evaluados. El extracto de hexano de *C. hypoleucus* mostro un mejor desempeño en 9 bacterias de 10 (excepto en *C. gingivalis*), capaz de disminuir el crecimiento bacteriano al 50% en todas las bacterias evaluadas, siendo este extracto el único con este desempeño y con las concentraciones más bajas a la inhibición. El extracto de metanol de *L. frutescens* tuvo una mejor CI<sub>50</sub> con la bacteria *A. actinomycetemcomitans* spo. a. El extracto de acetato de etilo presento la mejor CI<sub>50</sub> frente a *C. gingivalis* solamente. Por lo tanto de acuerdo a la CMI e CI<sub>50</sub> presentadas en la primera evaluación antimicrobiana el extracto con mejor desempeño en las 10 bacterias evaluadas fue el extracto de hexano.

Las bacterias evaluadas fueron en la mayoría Gram negativas de importancia mencionarlo debido a la diferencia en la composición de la pared bacteriana, lo cual le confiera una mayor resistencia e incapacidad de traspasar este mecanismo de defensa; A excepción de: *P. micra*, *S. mutans*, *A. viscosus* y *S. sanguinis*, y representativas en cuanto a su alterada presencia en enfermedad periodontal.

En *P. micra*, *A. viscosus* conjuntamente con *V. parvula* no se alcanzó la CMI con los extractos crudos evaluados, dos de estas bacterias son Gram-positivas, por lo que su mayor cantidad de peptidoglucano en su envoltura celular, les confirió mayor resistencia a los extractos, además de mayor capacidad adaptativa y mecanismos intrínsecos ya conocidos, como bombeo de la droga al exterior, o producción de toxinas para inhabilitar estas drogas. En el caso de *V. parvula*, tiene la capacidad de producir lipopolisacáridos altamente tóxicos y además de resistencia a las condiciones del ambiente que lo rodea, así como resistencia a la fagocitosis y a la acción bactericida del ambiente.

En las enfermedades periodontales de acuerdo a lo observado en estudios anteriormente realizados, lo que se busca es mantener un equilibrio en la ecología bucal y no eliminar este nicho ecológico, ya que tanto en estado de enfermedad como de salud se encuentran las mismas bacterias, lo que se altera es la cantidad de algunas de estas especies en estados de enfermedad, buscando disminuir a las que se observan aumentadas en estados patológicos y no

afectar de un modo significativo aquellas que se encuentran en mayor cantidad en un estado de salud. Entre estas bacterias se encuentran *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. intermedia*, *S. mutans* entre otras. El extracto crudo de hexano fue el que tuvo mejor desempeño, inhibiendo bacterias del complejo naranja y rojo, en este caso principalmente a *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. micra*, *P. intermedia* así como *S. mutans* a la concentración más alta, el cual esta intimidante relacionado con caries dental; lo cual es de vital importancia para una aplicación futura y uso de este extracto en padecimientos bucales tal como la enfermedad periodontal.

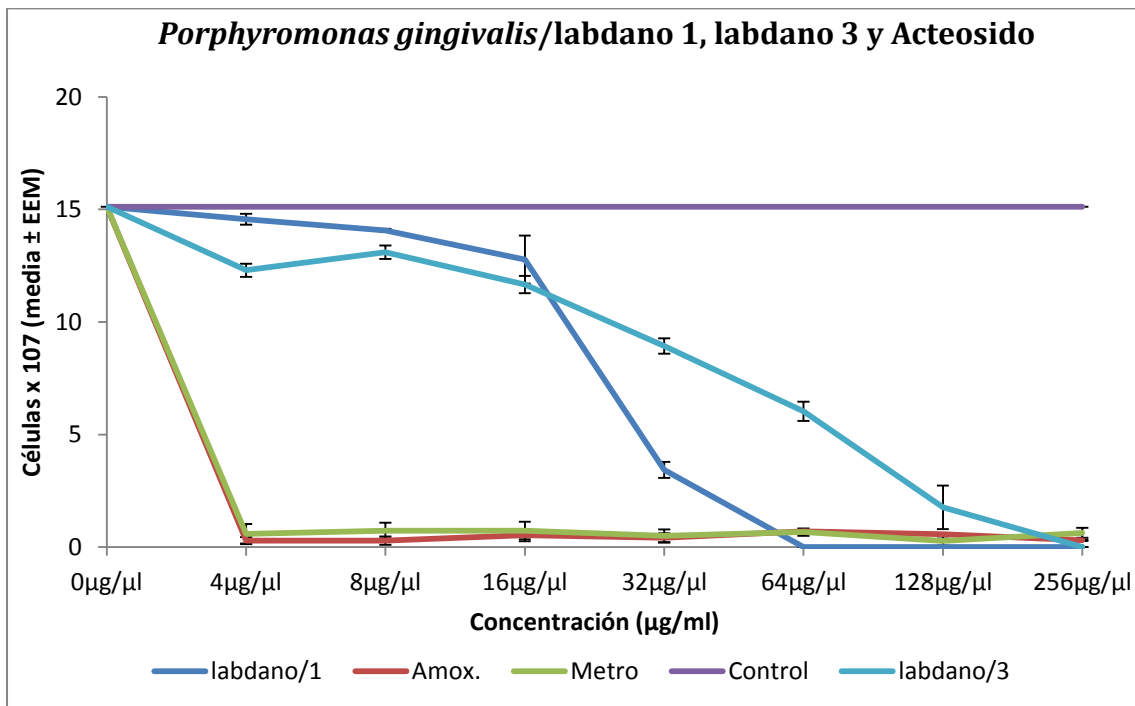
Respecto al comportamiento bacteriano a diferentes concentraciones, se observó un comportamiento no lineal en la inhibición concentración-efecto en algunas bacterias, de acuerdo a lo esperado ( mayor concentración-menor crecimiento) en algunas bacterias se observó la gráfica en forma de campana o U inversa; esto podría ser explicado por el fenómeno denominado Hormesis, el cual puede ser considerado como una respuesta adaptativa, caracterizada por una respuesta bifásica a la reacción de la dosis, de características cuantitativas similares con respecto a la amplitud y rango de la reacción estimulante, que son ya sea directamente inducidas o el resultado de la compensación del proceso biológico siguiente a una disrupción inicial en la homeostasis.

El comportamiento también depende de cada extracto, ya que cada uno posee compuestos distintos, en este caso los compuestos poco polares mostraron mejor efecto que los polares, el extracto de hexano de *C. hypoleucus* tuvo en general un mejor desempeño, esto debido a la presencia del labdano 1, el cual fue el responsable del efecto antibacteriano, además de ser el mayoritario; estos labdanos tienen la capacidad de atravesar fácilmente la envoltura celular bacteriana y causar un daño a sus estructuras.

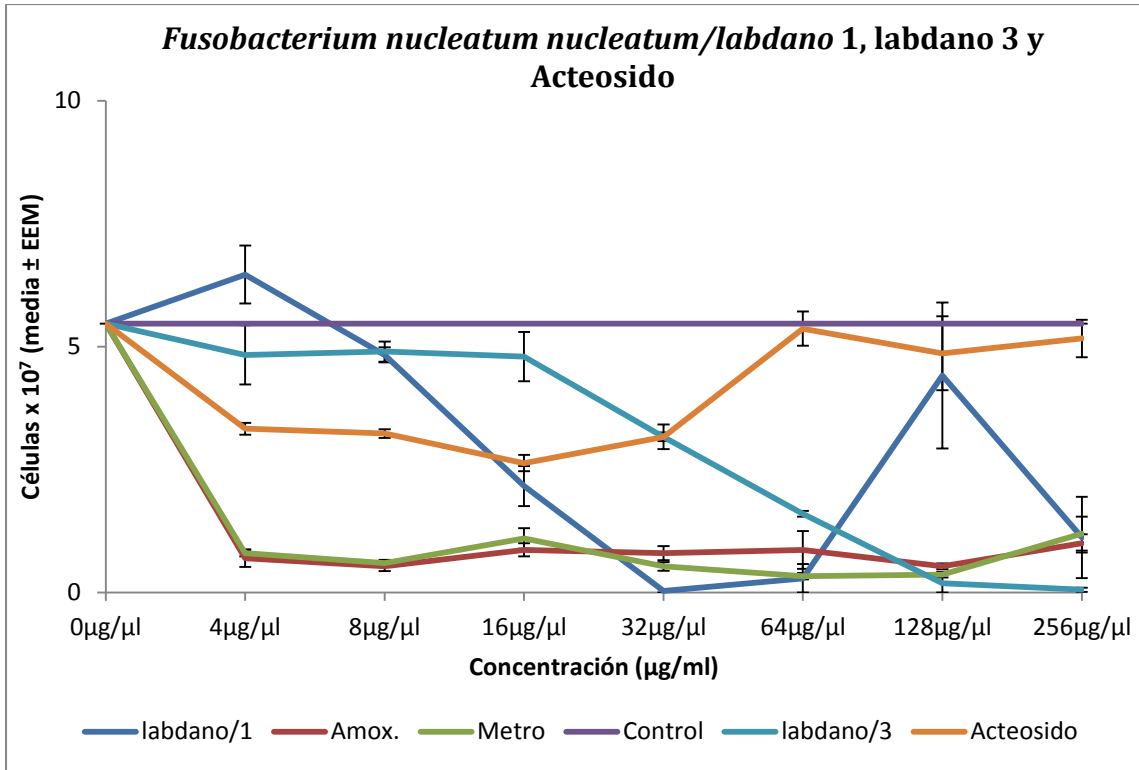
El extracto crudo de metanol de *L. frutescens* el efecto se debe a la presencia de un acetosido, el cual a altas concentraciones estimulaba el crecimiento, tal vez esto por la presencia de compuestos que servían de alimento extra y así promovían su crecimiento, tal cual como azúcares.

### 4.2.3. Evaluación de compuestos puros

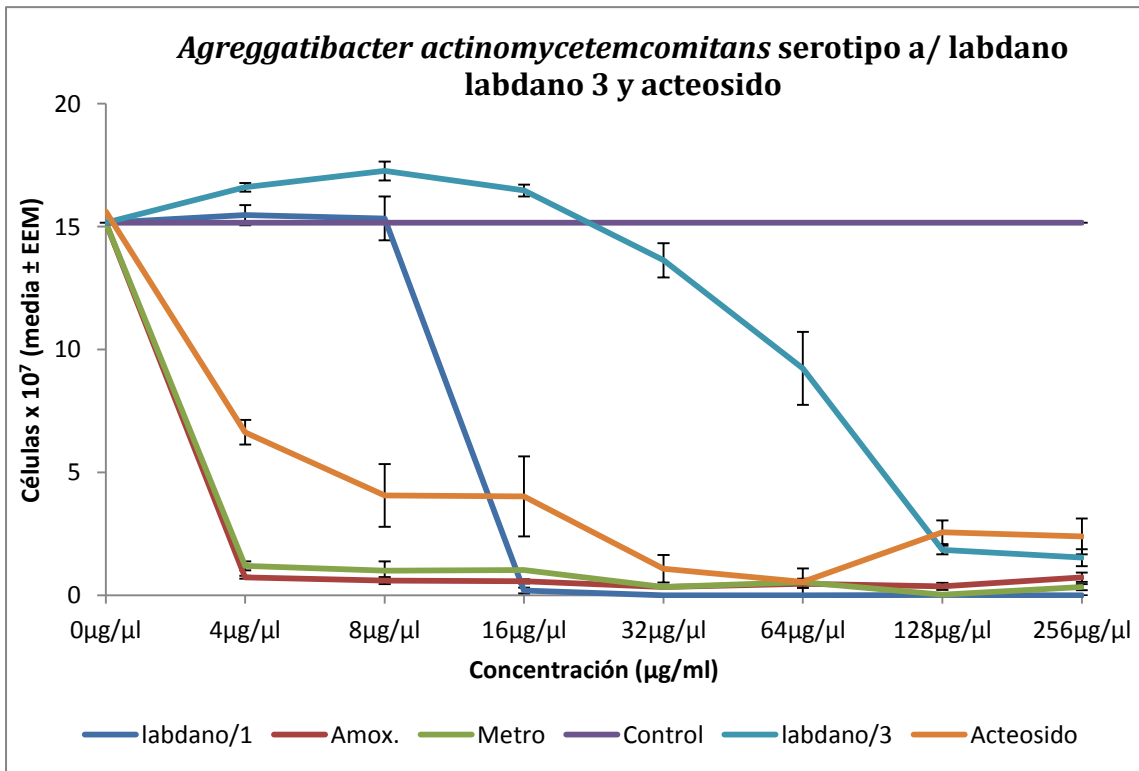
Se muestra a continuación los resultados de la inhibición bacteriana de los dos labdanos (**1** y **3**) mayoritarios aislados de *C. hypoleucus* y un acteosido del extracto de metanol de *L. frutescens*. Los graficas muestran eje (Y) número de células y (X) concentraciones evaluadas.



**Figura 51.** inhibición bacteriana *P. gingivalis* contra labdano 1, labdano 3 y acteosido



**Figura 52.** inhibición bacteriana *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* contra labdano 1/labdano 3 y acteosido



**Figura 53.** inhibición bacteriana *A.a.* a contra labdano 1/labdano 3 y acteosido.

#### 4.2.4 Resultados estadísticos compuestos aislados

**Tabla 19.** resultado de la significancia que se obtuvo de las tres bacterias evaluadas en el segundo ensayo de *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y *A.a.* a.

<i>Variable</i>	<i>Significancia</i>
Extracto	0.001
Concentración	0.001

Variable dependiente: Número de células bacterianas

**Tabla 20.** Grupos homogéneos, en orden de significancia A el de mayor significancia y en orden decreciente B, C, D, E. N/E= No evaluado.

<i>Extracto</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>F. n. n.</i>	<i>A.a.a</i>
Labdano 1	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>
Labdano 2	<b>C</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Acteosido	<b>N/E</b>	<b>C</b>	<b>A, B</b>
Amoxicilina	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Metronidazol	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A, B</b>
Concentración			
256 µg/ml	<b>A</b>	<b>A, B</b>	<b>A</b>
128 µg/ml	<b>A</b>	<b>A, B</b>	<b>A</b>
64 µg/ml	<b>B</b>	<b>A, B</b>	<b>A, B</b>
32 µg/ml	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A, B</b>
16 µg/ml	<b>D</b>	<b>B, C</b>	<b>C</b>
8 µg/ml	<b>D</b>	<b>C, D</b>	<b>C</b>
4 µg/ml	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>B</b>
0 µg/ml	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>

**Subconjuntos Homogéneos:** mejor efecto mostrado por los controles positivos (metronidazol y amoxicilina) en los tres microorganismos evaluados, para los compuestos puros el que presentó mejor desempeño fue el labdano 1 contra *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y *A.a.a*, seguido por el labdano 2 que mostró buen efecto contra *P. gingivalis* y *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y por último el acteosido que tuvo buen desempeño frente a *A.a.a*. Para las concentraciones 256 µg/m y 128 µg/ml fueron las de mayor significancia.

Se aislaron 3 labdanos del extracto de hexano de *C. hypoleucus*, de los cuales solo se evaluaron el 1 y 3, donde el labdano 1 demostró ser el causante del efecto antimicrobiano de este extracto evaluado, estos labdanos son denominados Diterpenos los cuales poseen una anillo de furano en su estructura, el cual podría ser el causante de su efecto antimicrobiano y causar un daño en el ADN bacteriano, al igual que algunos nitroimidazoles, los cuales tiene una acción sobre el ADN bacteriano. Además de poseer un aldehído el cual podría afectar a la pared celular, ya sea oxidándola o por lisis y así estallamiento por las presiones osmóticas del medio o expulsión de sus organelos y muerte.

El acteosido aislado del extracto de metanol de *L. frutescens* podría deberse su efecto antimicrobiano a la presencia de ácido caféico en su estructura, el cual ha demostrado en estudios *in vitro* un efecto anti-fungicida.

Las CMI presentadas en los compuestos aislados fueron mucho más bajas, corroborando a estas como responsables del efecto, las presentamos a continuación:

**Tabla 21.** CMI de la segunda evaluación.

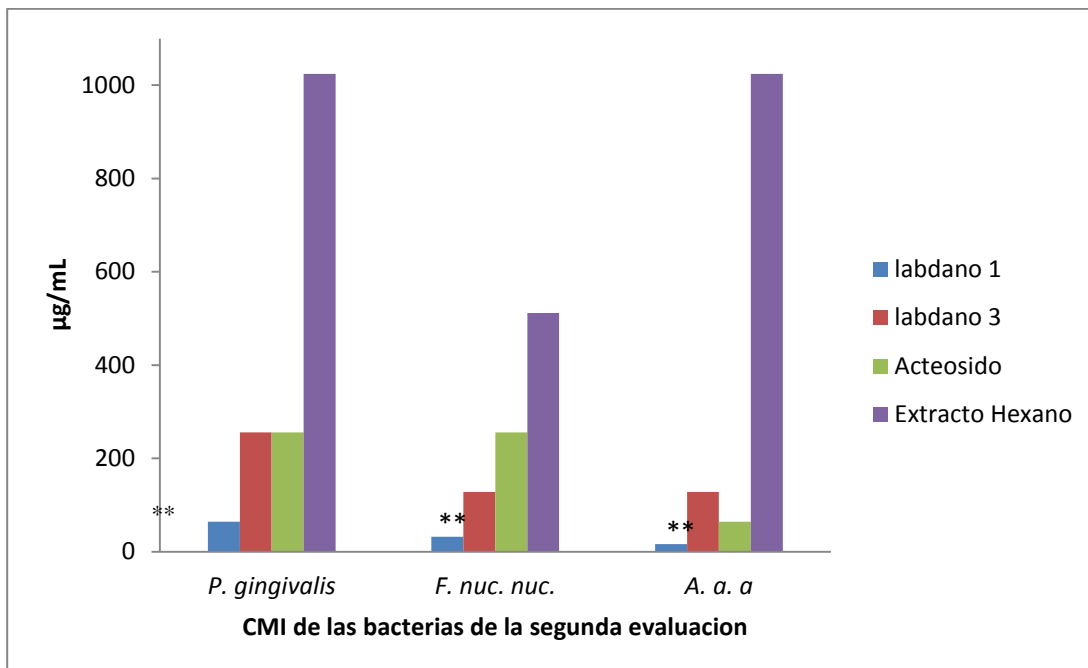
Bacteria	Compuesto	CMI
<i>P. gingivalis</i>	Labdano 1	64 µg/ml
<i>P. gingivalis</i>	Labdano 3	256 µg/ml
<i>P. gingivalis</i>	Acteosido	N/e
<i>F. n. n.</i>	Labdano 1	32 µg/ml
<i>F. n. n.</i>	Labdano 3	128 µg/ml
<i>F. n. n.</i>	Acteosido	N/p
<i>A. a. a</i>	Labdano 1	16 µg/ml
<i>A. a. a</i>	Labdano 3	128 µg/ml
<i>A. a. a</i>	Acteosido	64 µg/ml

En la tabla 21 observamos la CMI de los extractos puros, la cual disminuyó en comparación con el extracto puro evaluado anteriormente, en 10 veces en *P. gingivalis* para el labdano 1 y en 22 veces para *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* para *A. actinomycetemcomitans* serotipo a 60 veces, disminuyendo la concentración y aumentando el efecto. Para el labdano 3 se disminuyó solo en .5 veces en *P. gingivalis* y 4 veces para *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* serotipo a en 4 veces. Para el acteosido no presento CMI en *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y para *A. actinomycetemcomitans* serotipo a disminuyó 9 veces. Por lo tanto, el mejor efecto del compuesto puro fue para el labdano 1.

**Tabla 22.** CI<sub>50</sub> µg/ml de la segunda evaluación antimicrobiana.

CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Amox	Labdano 1	Acteosido
<i>P. gingivalis</i>	4	25	N/e
<i>F. n. n.</i>	4	32	14
<i>A. a. a</i>	4	11	2.70

De acuerdo a la CI<sub>50</sub> (tabla 22) el labdano 1 tuvo mejor desempeño frente a *P. gingivalis*, en *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* el acteosido tuvo mejor inhibición al igual que en *A. actinomycetemcomitans* serotipo a.



**Figura 54.** Compuestos puros evaluados en comparación con el extracto crudo de hexano.

Como se observa en la anterior figura 67 y tablas 25 y 26, el labdano 1 fue el responsable del efecto antimicrobiano, además de ser el más abundante del extracto de hexano de *C. hypoleucus* encontrándose en una proporción del 8% respecto a la parte soluble del extracto crudo, a la vez que su comportamiento fue directamente proporcional de la concentración-efecto del compuesto puro, el extracto crudo de metanol de *L. frutescens*, el acteosido, tuvo un rendimiento del 30% respecto a el extracto crudo.

Los labdanos 1-3 de *C. hypoleucus* así como el acteosido de *L. frutescens* aislados, fueron identificados por medio de RMN de  $H^1$  y  $C^{13}$  además de HSQC y HMBC, se compararon con los ya descritos en la literatura. Los labdanos resultaron ser por primera vez descritos de acuerdo a sus datos espectroscópicos. En el espectro de  $H^1$  se observan señales 10 ppm de la posición 20, esto debido a la presencia de un grupo carbonilo presente en el labdano 1 y 2; a diferencia del labdano 3 el cual tiene ausente esta señal.

En la RMN de  $H^1$  se observa a 6 y 7.5 ppm las señales características del anillo de furano (posiciones 14-16) y en la zona de 1 a 3 ppm los grupos metilo (17, 18 y 19). En el  $C^{13}$  observamos desplazado a 207 ppm la señal del carbono 20 que corresponde al carbonilo esto debido a la presencia del oxígeno por lo cual hay un desapantallamiento. Entre 110 y 150 ppm observamos las señales del anillo de furano y al igual que en la RMN de  $H^1$  las señales entre



10 a 20 ppm de los metilos, además de las señales 3 y 4 donde se encuentra el aldehído, el RMN de  $C^{13}$  las señales aparecen entre 60 y 70 ppm, y en la RMN de  $H^1$  a 3 ppm. Los tres labdanos fueron muy similares, los cambios entre el labdano 1 y 2, se debieron a la presencia de un grupo carbonilo en la posición 12 presente en el labdano 1 y ausente en el labdano 2, presente a 7.3 ppm en el labdano 1 y desplazándose a 1.2 ppm en el labdano 2; esto por la ausencia del doble enlace con el oxígeno por lo cual hay un desapantallamiento.

En el labdano 3 en la posición 20 y 12 tiene la presencia de un enlace de oxígeno además de alcohol; desplazando se la señal 20 de 10 ppm en la RMN de  $H^1$  a 4.6 ppm, en la RMN de  $C^{13}$  la señal 20 se desplazó a 105 ppm debido a la presencia de un enlace con el oxígeno y estando más desapantallado la señal 12, ya que siente la señal de los dos oxígenos cercanos.

El acteosido ya ha sido previamente identificado, solo se corroboraron las señales de  $H^1$  de  $C^{13}$ , así como HMBC a dos enlaces acuerdo con la literatura.

## 5. Discusión

El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de *C. hypoleucus* y metanol de *L. frutescens* en especies de la placa dentobacteriana subgingival así como identificar los principales metabolitos secundarios mayoritarios de estos compuestos. A partir de estos últimos, se realizó una segunda evaluación microbiológica con el objeto de conocer el efecto antibacteriano de cada uno de ellos. En la determinación de actividad antimicrobiana, las especies seleccionadas comprendieron especies compatibles con salud periodontal, patógenas putativas y patógenas reconocidas representativas de los complejos bacterianos de la placa dentobacteriana subgingival (25), lo cual permitió darle un enfoque más amplio para al estudio de especies involucradas en las enfermedades periodontales. En cuanto a los extractos obtenidos, se comprobó el contenido de los metabolitos secundarios más representativos de *C. hypoleucus* y *L. frutescens* de acuerdo a lo descrito en la bibliografía(93).

De acuerdo a lo obtenido en el presente estudio, se observó mayor efecto antimicrobiano en especies patógenas reconocidas y patógenas putativas con la determinación del efecto antimicrobiano del extracto no polar de *C. hypoleucus*; Este resultado es de relevancia, debido a lo mostrado en investigaciones previas. Así como lo descrito previamente en la literatura, en estudios donde se evaluó el efecto antimicrobiano *in vitro* de otros extractos en distintas especies de *Croton*. El efecto antimicrobiano del extracto de etanol de *C. sonderianus*, se reportó tener efecto en especies de *S. salivarius*, *S. mitis* y *S. sobrinus* (61). Por otro lado, en el efecto antimicrobiano de *C. gibsonianus* que reporta la inhibición de microorganismos fúngicos con *C. albicans* (63), y el efecto antimicrobiano de *C. urucurana* reportó la inhibición de bacterias Gram positivas como *S. aureus* (10). Estos últimos resultados, a pesar de que son reportes de extractos de plantas y microorganismos no analizados en el presente estudio, es de nuestro interés por el efectos antimicrobianos que pudieran estar en relación con los extractos del género *Croton*, dónde de acuerdo a la literatura, se sugiere que el género *Croton* tiene un efecto antibacteriano que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. Esto último, no concuerda con lo obtenido en el presente estudio, ya que las bacterias Gram positivas evaluadas tales como: *S. mutans* *S. sanguinis*, *P. micra* *A. viscosus*, necesitaron de una mayor concentración para ser inhibido su crecimiento y en algunas no se alcanzó la CMI para su inhibición. Las bacterias que mejor se inhibieron fueron Gram negativas tales como: *P.*

*gingivalis*, *V. parvula*, *F. nucleatum subsp. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans serotipo a*, *P. intermedia*, *C. gingivalis*. Con este último resultado, se sugiere que la constitución de los extractos de hexano y metanol y sus compuestos mayoritarios diterpenos del tipo labdano y el acteosido, intervienen en el efecto inhibitorio. Dada esta interrogante, procedimos a la identificación de los compuestos mayoritarios del extracto crudo de hexano; con lo cual, el presente estudio reporta tres labdanos nuevos del género *C. hypoleucus*, que no han sido previamente descritos en la literatura. Así mismo, el mejor efecto antimicrobiano de estos tres labdanos fue obtenido con el labdano 1 contra *P. gingivalis* y *F. nucleatum subsp. nucleatum* y en el acteosido inhibió el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans serotipo a*.

Por otro lado, la evaluación antimicrobiana del acteosido aislado de *L. frutescens*, demostró una buena inhibición de la especie para la bacteria *A. actinomycetemcomitans stp. a*, que a pesar de ser una especie bacteriana a la cual no se le ha encontrado relación con periodontitis crónica, hay estudios recientes que reportan su participación en consorcio con otras especies bacterianas en periodontitis agresiva localizada (94). Con lo cual podemos sugerir que la inhibición bacteriana de este sustrato, es alta en comparación con la de los extractos de *Croton*, de lo cual no hay reportes en la literatura.

De manera general, las especies bacterianas inhibidas tanto por el extracto crudo como por los labdanos evaluados (1 y 3) de *C. hypoleucus*, son principalmente especies patógenas putativas y patógenas reconocidas, mientras que la inhibición de las especies compatibles con salud periodontal se reportó un efecto moderado. Con lo cual se sugiere que dicho extracto es un buen inhibidor *in-vitro* de especies representativas de la placa dentobacteriana subgingival, dónde se esperaría encontrar en condiciones de salud periodontal un equilibrio de colonización microbiana dónde se cuente con mayor proporción de especies compatibles con salud periodontal o “periodontobenélicas”, y con menor proporción de especies patógenas(25). Así mismo, se sugiere que los labdanos 1 y 3 de *C. hypoleucus* pudieran utilizarse en futuras aplicaciones como coadyuvante para el tratamiento de enfermedades periodontales.

### **5.1. Conclusiones**

- Se aislaron 3 nuevos diterpenos del extracto de hexano de *C. hypoleucus*, de los cuales se evaluaron el 1 y 3.

- El extracto de hexano tuvo el mejor comportamiento de los extractos evaluados de *C. hypoleucus*, siendo corroborado con el aislamiento y elucidación del compuesto mayoritario que fue, el labdano 1.
- Se aisló un acteosido del extracto de metanol de *L. frutescens*, el cual demostró ser el responsable del efecto antimicrobiano contra *A. actinomycetemcomitans* stp. a.
- El presente trabajo da base para la aplicación de los extractos de *C. hypoleucus* en futuras investigaciones aplicado a otro tipo de enfermedades infecciosas, para la evaluación de su efecto antimicrobiano.

## 5.2. Perspectivas

- De acuerdo a los resultados obtenidos, se planea continuar con la presente investigación, realizando pruebas de toxicidad *in vivo* en modelo animal, para evaluar la dosis letal media (DLm) así como cambios en pH salival.
- Realizar estudios *in vivo* en pacientes con enfermedades periodontales, ya que el efecto difiere de un sistema *in vitro* a uno *in vivo*.
- Realizar estudios para saber el mecanismo de acción específico de los compuestos aislados, ya sea mediante proteómica u otro ensayo.
- El objetivo final es obtener un enjuague bucal o pasta dental con los extractos crudos de metanol de *L. frutescens* y de Hexano de *C. hypoleucus*.
- Es de relevante incluir en el presente estudio la Concentración mínima bactericida (CMB) para los microorganismos evaluados, y realizar más pruebas de viabilidad a distintos tiempos de exposición a los extractos y compuestos aislados.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbara Schmidt DMR, Alexander Poulev, Sithes Logendra, William T. Cefalu, Ilya Raskin. A natural history of botanical therapeutics. Elsevier Fitoterapia. 2008;57(1):3-9.
2. Esparza RRd. Uso de plantas Medicinales en Odontología. In: UNAM, editor. 5to Congreso de Biología Oral; Facultad de Odontología 2009. p. 44.
3. Piñon YR. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. Journal of Ethnopharmacology. 2012;30:6.
4. Elizondo MG. Plantas medicinales del estado de Durango y Zonas Aledañas. 1000 ed. Centro Historico, México, D.F.: Talleres Gráficos de la dirección de publicaciones del Instituto Politecnico Nacional; 2004. 144 p.
5. Steinmann V. Diversidad y Endemismo de la Familia Euphorbiaceae en México. Acta Botanica Mexicana 2002;61:61-93.
6. Gallardo VC. Farmacognosia: Breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias medicas. Rev Biomed 2004;15(2):123-36.
7. Nardi GM. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. Phytomedicine. 2003;10.
8. Geisson Marcos Nardi a b, , Silvia DalBó b, Franco Delle Monached, Moacir Geraldo Pizzolatti c, Rosa Maria Ribeiro-do-Valle b. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 2006;107:73-8.
9. Hernandez DM. Ent-trachyloban-19-oic acid isolated from *Iostephane heterophylla* as a promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. Elsevier Fitoterapia 2012;10.
10. Marize T.L.P. Peres FDM, Alexandre Bella Cruz, Moacir G. Pizzolatti, Rosendo A. Yunes. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 1997;56:223-6.
11. Izzo FCGGAA. Fitoterapia Impiego razionale delle droghe vegetali. Fitofarmacia I---, editor. Italia 2006. 995 p.
12. Salatino A. Traditional uses, Chemistry and pharmacology of *Croton* species. J Braz Chem Soc. 2007;18(1):11-33.
13. Herrera Arias F. G-RRO. Evaluacion in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canel y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patogenas de origen alimentario. BISTUA. 2006;4:13-9.
14. Gordillo MM. Los generos de la familia euphorbiaceae en mexico (parte A). Anales del Instituto de Biología serie botanica. 2002;73(002):155-96.
15. Quevedo R. Contribución al estudio químico y bioactividad de dos especies nativas: (*Croton bogotanus* Cuatr. y *Croton Funckianus* Cuatr.) Euphorbiaceae. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2007;13(33):391-3.
16. Jose G. M. da Costa FFGR, Elissandra C. Angelico, Carla K. B. Pereira, Erlanio O. de Souza, Germana F. R. Caldas, Monalisa R. Silva, Nara K. A. Santos, Magaly L. Mota, Paula F. dos Santos. Composicao química e avaliacao da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008;18(4):586-.
17. Muriel Sylvestre AeP, Angélique Longtin, Francine Nagau, Jean Legault. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. Journal of Ethnopharmacology. 2006;103:99-102.

18. al MPse. enfermedad periodontal como factor d riesgo para partos pretermino y nacimiento de niños con bajo peso. *Medisan*. 2006;10.
19. Maestre JRMVM. Bacteremia Secundaria a procedimientos odontologicos periodontales. *Rev Esp Quimioter*. 2008;21(3):153-6.
20. Quintero MdCV. Tres concepciones Historicas del Proceso salud-enfermedad. Hacia la promocion de la salud. 2007;12:41-50.
21. Vergara KMA. Prevalencia de caries y enfermedad periodontal en estudiantes del programa de odontologia d la universidad de cartagena en el segundo periodo del 2007: Cartagena de indias colombia; 2007.
22. Illueca FMA. Periodontal regeneration in clinical practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(E):382-92.
23. Botero JE BE. Determinants of periodontal diagnosis. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2010;3(2):94-9.
24. Fyvie LAX. Description of the subgingival Microbiota of periodontally Untreated Mexican subjects: Chronic periodontitis and periodontal Health. *J Periodontol*. 2006;10:460-71.
25. Sigmun Socransky ADH. Periodontal Microbial Ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.
26. N. EC. revision de la periodontitis crónica: Evolucion y su aplicacion clínica Av periodon Implantol 2008;1(20):27-37.
27. Haffajee A. SS. Plaque microbiology in health and disease Oral Biofilms in Health and disease Eastman Dental Institute, University College London 1999:255-82.
28. Alonso ER. Tratamiento Antibiotico de la Infeccion Odontogenica IT del sistema nacional de salud Madrid. 2009;33(3):67-79.
29. Fyvie LAX. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2000;27:722-32.
30. al. SJCe. Manual de pruebas de suceptibilidad antimicrobiana. congress Lo, editor 2005.
31. Lilia Benavides Placencia AIAO, Hector Javier Vazquez. Vigilancia de los niveles de uso de antibioticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la ciudad de México. *Salud Publica* 2005;47(3):219-26.
32. mateos PF. AGENTES ANTIMICROBIANOS Y MICROORGANISMOS Facultad de Farmacia Universidad de salamanca 2008.
33. Gertrudis HQ. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de ciprofloxacino en bacteriar uropatógenas aisladas del Instituto Nacional de enfermedades Neoplasicas. *Rev Med Hered* 2005;16(1):39-45.
34. Hidalgo MIH. Interpretacion de las pruebas de sensibilidad antmicrobiana. *SciElo*. 2004;39.
35. Mouton JW. Breakpoints: Current practice and future perspectives *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19:323-31.
36. Goran Kronvall. CGG, Gunnar Kahlmeter Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion *Int J Antimicrob Agents*. 2001;38:281-90.
37. Werner Bar UB-S, . Andreas Krebs,. Ludwig Cromme. Rapid Method for detection of minimal bactericidal concentration of antibiotics. *Journal of microbiology methods*. 2008;77:85-9.

38. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(5-16).
39. R. Taroco VS, . R. Vignoli. *Metodos de estudio de la sensibilidad bacteriana*. 2002. p. 663.
40. *Manual de procedimientos para la determinacion de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos*, (2001).
41. García AA. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (biologia) serie fisiologia vegetal*. 2009;2:119-45.
42. García DE. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*. 2004;27(1):1-12.
43. Diego Cortes IA, Almudena Bermejo, M. Carmen Zafra-Polo. *Pincipios Activos de las Plantas*. In: Masson, editor. *Fitoterapia*. México2003. p. 29.
44. Cragg G. M. NDJ. *Natural Products in Drug Discovery and Development Journal of Natural Products*. 1997;60:52-60.
45. Tapia GT. LA AGREGACIÓN CELULAR EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS VEGETALES IN VITRO. *Interciencia Scielo*. 2007;32(10):669-74.
46. Moore JA. *Experimental Methods in Organic Chemistry Volume 11976*. 334 p.
47. J.P BRByS. *Técnicas de Investiaación en Química Orgánica*. Internacional. P-H, editor1977.
48. G. More TT, N. Lall, F. Botha, J. Meyer. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;119:473-7.
49. Mireya Gonzalez Begne VQ, Elvia Reyes, Jose A. Banderas, Nicandro Yslas. *Sangunaria Mexicana (Polygonum aviculare) aplicaciones y beneficios*. *Ciencia Ergo Sum* 1999;6:118-23.
50. Palacios BGYV. *Estudio comparativo de la respuesta tisular al relleno alveolar a base de Aloe vera y Croton lechleri, en Alvéolos post exodoncia en incisivos de Cavia porcellus*. Lima, peru: Universal Nacional de San Marcos; 2009.
51. José Waizel-Bucay IMMR. *Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales*. *Revista ADM*. 2011;LXVIII:72-88.
52. García AR. *Elaboraión de Biopelículas a base de quitosan y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorgansmos periotontopatógenos Universidad Autónoma de Nuevo León* 2011.
53. Victoria Hall Ramiez MRP, Ericka Rodriguez Vega. *Plantas Medicinales Volumen II*. Centro de Informacion de Medicamentos. 2002.
54. Cruz-Antonio LS-M, María Elena; Guillén, Elena; Vidal, María de los Ángeles; Arrieta, Jesús. *Formulación y evaluación de un parche bucal compuesto de propóleo y Echinacea purpurea*. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 2001;42(4):50-6.
55. Robles DAC. *Actividad inhibitoria del crecimiento de Streptococcus mutans y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la Matricaria chamomilla manzanilla*. Lima, peru: Universidad Nacinal de San Marcos; 2010.
56. María J Mariani GNJV, Rafael Fernandez-Da Silva. *Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (Theobroma cacao L.) sobre el crecimiento de Streptococcus mutans in vitro*. *ODOUS CIENTIFICA*. 2010;11(1):15-22.
57. Dra. Bárbara E. García Triana DJCGP, Lic. Roberto de la Peña Pino, Dra. Amelia, L. García Montes de Oca DASB, Dr. Víctor Rodríguez Sosa, Dra. Nereida, Núñez RLyDMO.

Efecto de un extracto de *Mangifera indica* L. (Vimang) sobre la enfermedad periodontal por ligadura en perros beagle. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2005;24(2):sin dato.

58. Cruz CG. Efecto inhibitorio de la infusion de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre el crecimiento de microorganismos cariogenicos: *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans* in vitro. Guatemala: Universidad de Guatemala; 1995.

59. Valenzuela Melgarejo R IHC, Narváez CG. Efectividad del uso tópico de *Salvia officinalis* en la disminución del índice gingival en sujetos con gingivitis. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral.* 2011;4(3):110-3.

60. Hilda Moromi Nakata MGI, Lita Ortiz Fernández, Elba Martínez Cadillo, Katia Medina Calderon, Donald Ramos Perfecto P, Julio Ruiz Quiroz, Yuri Castro Rodríguez. Efectividad in vitro e in vivo de un gel a base de *Camellia sinensis* "té verde" frente a microorganismos de importancia en procesos periodontales. *Odontol Sanmarquina.* 2011;14(2):10-2.

61. Silva VAd. Efi cácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2011;40:69-72.

62. Medina-Baizabal MMG-AJCb-AÆIL, Sima´Polanco FtC-RRMn-GlÆP, May-Pat F. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24:1955-9.

63. K. S. Vinayaka DS, T. R. Prashith Kekuda, K. Bhagath, N. Mallikarjun. Antibacterial, antifungal and free radical scavenging activity of *Croton gibsonianus* Nimm. *Grah, (Euphorbiaceae).* *Journal of Natural Pharmaceuticals.* 2010;1(1).

64. OZBÍLGÍN S. Uses some *Euphorbia* species in traditional medicine in Turkey and their biological activities. *Turkey J pharm.* 2012;9:241-56.

65. Fuentes JC. Diterpenos y otros Constituyentes del *Croton hirtus* (euphorbiaceae). *Revista de Biología Tropical.* 2004;58.

66. Manjit Inder Singh Sagao SW, Ravneet Kaur. Evaluation Genotoxic and antimicrobial potential of *Croton bonplandianum* Baill. . *Scholars Research Library.* 2010;2(2):211-6.

67. Banerjee GCSSS. Synergistic effect of *Croton caudatus* (fruits) and *Tiliacora acuminata* (flowers) extracts against filarial vector *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2012:1-6.

68. R. M. Murillo JJ, J. Rivera, V. H. Castro. Diterpens and other constituents from *Croton draco* (*Euphorbiaceae*) *Rev Biol Trop.* 2001;49(1):256-64.

69. Ester Risco RV, Amelia Henriques, Salvador Cañigüeral. Bases químicas y Farmacológicas de la utilización de la sangre de drago. *Revista de Fitoterapia.* 2005;5(5):101-14.

70. Sahar El-Mekkawy MRM, Norio Nakamura, Masao Hattori, Takuya Kawahata, Toru Otake. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry.* 2000;53:457-64.

71. Tsacheva I. RJ, Iossifova T., Vogler B., Odjakova M., Navas H. Et. al. Complement Inhibiting Properties of Dragon's Blood From *Croton draco*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung.* 2004;939.

72. Doval MS. estimulación de la actividad peptica del jugo gástrico, inducida por latex de *Croton palanostigma*. *Anales de la facultad de medicina Lima peru.* 2008;69(3).

73. Jose Luis Lazo Chambilla MPV. Extracto de *Croton lecheri* y de *Pelargonium robertianum* L. en el tratamiento de la gingivitis asociada al embarazo. *KIRU.* 2007;4(2):52-9.



74. R. Ubillas SDJ, R.C. Bruening, M.R. Kernan<sup>1</sup>, S.R. King, D.F. Sestin, M. Barrett, C.A. Stoddart, T. Flaster, J. Kuo, F. Ayala, E. Meza<sup>1</sup>, M. Castañel, D. Mcmeekin, E. Rozhon, M.S. Tempesta, \*, D. Barnard, J. Huffman, D. Smee, R. Sidwell, K. Soike, A. Brazier<sup>4</sup>, S. Safrin<sup>5</sup>, R. Orlando<sup>6</sup>, P.T.M. Kenny<sup>6</sup>, N. Berova<sup>7</sup>, t, K. Nakanish. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). *Phytomedicine*. 1994;1(2):77-106.
75. L.Castro MCOCKSDBC-pLLLHSBMAMMS. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2010;107:1193-204.
76. Ken-ichi Nihei YA, Yoshihiro Mine, Yoichi Yamada, Masayuki Iigo, Tadashi Yanagisawa, Isao Kubo Musiduni and Musidol, Insects Antifeedants from *Croton jatrophioides*. *Journal of Natural Products*. 2006;69:975-7.
77. Alírica I. Suarez RSC, Maria Salazar Bookaman, Stephen Tillett, Franco Delle Monache, Camilo Di Giulio, Gustavo Bruges. Antinociceptive and Anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;88:11-41.
78. Alírica I. Suárez RSC, Maria M. Salazar-Bookaman , Stephen Tillett , Franco Delle Monache , Camilo Di Giulio , Gustavo Bruges Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;88:11-4.
79. Fischer H. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lecheri* inhibits CTFR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;93:351-7.
80. Bernard Weniger LL, Catherine Vonthron-Sénécheau ,Tomabu Adjobimey , Joachim Gbenou , Mansourou Moudachirou ,Reto Brun e, Robert Anton , Ambaliou Sanni. Evaluation of ethnobotanically selected Benin medicinal plants for their *in vitro* antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90:279-84.
81. G.M. Molina Salinas APL, P. Becerril Montes, R. Salazar Aranda, S. Said Fernández, N. Waksman de Torres. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;109:435-41.
82. Isaías Balderas Renteria MdRCC, Pilar Carranza Rosales, Hector G. Lozano Garza, Dalila Castillo Nava, Francisco J. Alvarez Mendoza, Elsa M. Tamez Cantu. Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on winstar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Annals of Hepatology*. 2007;6(4):251-4.
83. Gloria M. Molina Salinas VMRG, Salvador Said Fernandez, David C. Lankin, Marcelo A. Muñoz, Pedro Joseph Nathan, Guido F. Pauli, Noemí Waskman. Stereochemical Analysis of Leubethanol, an anti-TB-active serrulatane, from *Leucophyllum frutescens*. *Natural Products*. 2011;74:1842-50.
84. Vega EAM. aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Bougainvillea glabra*; *Leucophyllum frutescens* y *Eriobotrya japonica*: Universidad Autónoma de Nuevo Leon; 1997.
85. Peryra JRH. Enfermedad Periodontal : prevalencia y algunos factores asociados en escolares de una región mexicana. *Asociacion Dental Mexicana* 2000;57(6):222-30.
86. valle AO. Relación entre enfermedad periodontal, infección bacteriana ascendente y patología placentaria con parto prematuro. *Revista médica de Chile*. 2009;137.
87. S. EG. Enfermedad periodontal y cardiopatía coronaria *Boletín Escuela de Medicina UC Chile*. 2006;31(1).
88. A. BM. las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas *Av periodon Implantol*. 2005;17(3):147-56.

89. A. BM. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones odontogénicas. *Avances en Odontología*. 2005;21(6):311-31.
90. Oliveira IS. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18:587-93.
91. Bravo MA. Bacterias Anaerobias. Universidad del Cauca
92. Rodríguez JAG. procedimientos en microbiología clínica 2000.
93. James D. McChesney AMC, Edilberto R. Silveira. . Antimicrobial Diterpenes of *Croton sonderianus*. II. *Pharmaceutical Research*. 1991;8(10):1243-7.
94. Daniel H. Fine KM, Karen Fairlie, Debbie Tischio-Bereski, Javier Ferrendiz, David Furgang, Bruce J. Paster and Floyd E. Dewhirst. A Consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* Is Present in Sites Prior to Bone Loss in a Longitudinal Study of Localized Aggressive Periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(9).

## 7. ANEXOS

### 7.1. Índice de figuras

Figura 1. Complejos bacterianos en la placa subgingival relacionados con las enfermedades periodontales. (Tomado de Socransky, <i>et al.</i> (25)).	5
Figura 2. Metabolismo primario y secundario del ciclo de carbono en plantas.	12
Figura 3. Métodos extractivos para la obtención de metabolitos secundarios.	14
Figura 4. Arbusto de <i>Croton hypoleucus</i> .	18
Figura 5. Clerodanos aislados de <i>C. cajucara</i> .	20
Figura 6. Leubetanol aislado de <i>L. frutescens</i> .	24
Figura 7. Secado del material vegetal.	27
Figura 8. Disminución de la partícula del material vegetal.	28
Figura 9. Eliminación del disolvente con rotaevaporador.	29
Figura 10. Columna de gel sílice 60 para extracto de hexano.	31
Figura 11. Esquema del proceso de separación de las fracciones obtenidas de la columna gel sílice 60.	32
Figura 12. Cromatografía de capa fina parte soluble del extracto de hexano.	33
Figura 13. Cromatografía en capa fina del labdano 2.	34
Figura 14. Cromatografía en capa fina del labdano 1.	35
Figura 15. Cromatografía en capa fina del labdano 3.	36
Figura 16. Cromatografía en placa fina de los fracciones 4-6 del acteosido revelador cloruro férrico.	37
Figura 17. Modelo para la determinación de las concentraciones óptimas, CH: <i>C. hypoleucus</i> extracto de hexano, CAC: <i>C. hypoleucus</i> extracto de acetato de etilo, CM: <i>C. hypoleucus</i> extracto de metanol, CA: <i>C. hypoleucus</i> extracto acuoso, LM: <i>L. frutescens</i> extracto de metanol.	39
Figura 18. Pozos para diluciones seriales.	40
Figura 19. Modelo para la resta de la densidad de extractos, CH: <i>C. hypoleucus</i> extracto de hexano, CAC: <i>C. hypoleucus</i> extracto de acetato de etilo, CM: <i>C. hypoleucus</i> extracto de metanol, CA: <i>C. hypoleucus</i> extracto acuoso, LM: <i>L. frutescens</i> extracto de metanol.	41
Figura 20. Modelo para la evaluación de extractos crudos. CH: <i>C. hypoleucus</i> extracto de hexano; CAC: <i>C. hypoleucus</i> extracto de acetato de etilo, CM: <i>C. hypoleucus</i> extracto de metanol; CA: <i>C. hypoleucus</i> acuoso; LM: <i>L. frutescens</i> extracto de metanol. Am: amoxicilina; Me: Metronidazol.	43
Figura 21. Modelo para evaluación de extractos puros. CH: <i>C. hypoleucus</i> extracto de hexano; CAC: <i>C. hypoleucus</i> extracto de acetato de etilo, CM: <i>C. hypoleucus</i> extracto de metanol; CA: <i>C. hypoleucus</i> acuoso; LM: <i>L. frutescens</i> extracto de metanol. Am: amoxicilina; Me: Metronidazol.	44
Figura 22. RMN de $H^1$ a 400 MHz del extracto crudo de hexano en $CDCl_3$ .	46
Figura 23. RMN de $H^1$ a 400 MHz de la parte insoluble del proceso de eliminación de grasas y ceras en $CDCl_3$ .	47
Figura 24. RMN de $H^1$ a 400 MHz en $CDCl_3$ de la parte soluble del extracto de hexano.	48
Figura 25. RMN de $H^1$ a 400 MHz en $CDCl_3$ del labdano 2.	48
Figura 26. RMN de $C^{13}$ a 100 MHz en $CDCl_3$ del labdano 2.	49

Figura 27. HSQC del labdano 2.....	50
Figura 28. RMN H <sup>1</sup> a 400 MHz en CDCl <sub>3</sub> del labdano 1.....	51
Figura 29. RMN de C <sup>13</sup> a 100 MHz en CDCl <sub>3</sub> del labdano 1. ....	52
Figura 30. HSQC del labdano 1.....	52
Figura 31. RMN de H <sup>1</sup> a 400 MHz en CDCl <sub>3</sub> del labdano 3. ....	53
Figura 32. RMN de C <sup>13</sup> en CDCl <sub>3</sub> del labdano 3. ....	54
Figura 33. HSQC del labdano 3.....	54
Figura 34. Parte soluble del extracto de metanol.....	55
Figura 35. RMN de H <sup>1</sup> a 400 MHz del acteosido. ....	55
Figura 36. RMN de C <sup>13</sup> a 100 MHz del acteosido. ....	56
Figura 37. HMBC de dos y tres enlaces. ....	56
Figura 38. Evaluación de los extractos crudos frente a <i>P. gingivalis</i> , los controles positivos fueron evaluados a una concentración de .5-32 µg/ml en todas las bacterias. ....	57
Figura 39. . Evaluación extractos crudos contra <i>P. intermedia</i> . ....	57
Figura 40. Evaluación extractos crudos contra <i>C. gingivalis</i> . ....	58
Figura 41. Evaluación extractos crudos contra <i>V. parvula</i> . ....	58
Figura 42. Evaluación extractos crudos contra <i>S. mutans</i> . ....	59
Figura 43. Evaluación extractos crudos contra <i>S. sanguinis</i> ....	59
Figura 44. evaluación extractos crudos contra <i>A. viscosus</i> .....	60
Figura 45. Evaluación extractos crudos contra <i>P. micra</i> .....	60
Figura 46. Evaluación extractos crudos contra <i>A. a. a</i> .....	61
Figura 47. Evaluación extractos crudos contra <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> .....	61
Figura 48. Desempeño de las bacterias evaluadas a 512 µg/ml contra los extractos crudos. ...	65
Figura 49. Desempeño de las bacterias evaluadas a 512 µg/ml contra los extractos crudos. ...	65
Figura 50. Desempeño de las bacterias evaluadas a 512 µg/ml contra los extractos crudos. ...	66
Figura 51. inhibición bacteriana <i>P. gingivalis</i> contra labdano 1, labdano 3 y acteosido .....	69
Figura 52. inhibición bacteriana <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> contra labdano 1/labdano3 y acteosido .....	70
Figura 53. inhibición bacteriana <i>A.a. a</i> contra labdano 1/labdano 3 y acteosido. ....	70
Figura 54. Compuestos puros evaluados en comparación con el extracto crudo de hexano.....	73

## 7.2. Índice de tablas

Tabla 1. Métodos de extracción discontinua. ....	15
Tabla 2. Plantas más comúnmente utilizadas para padecimientos bucales a nivel mundial. ....	16
Tabla 3. Taxonomía de <i>Croton hypoleucus</i> . ....	17
Tabla 4. Uso farmacológico del género <i>Croton</i> . ....	21
Tabla 5. Especies de <i>Croton</i> con efecto antibacteriano. ....	22
Tabla 6. Principales usos del género <i>Croton</i> en enfermedades bucales. ....	22
Tabla 7. Taxonomía de <i>L frutescens</i> . ....	23
Tabla 8. Rendimiento de los extractos obtenidos en dos épocas del año distintas. ....	29
Tabla 9. Polaridades utilizadas para la separación de fracciones. ....	32
Tabla 10. Agrupación de las fracciones obtenidas de parte soluble del extracto de hexano así como rendimiento. ....	33
Tabla 11. Fracciones obtenidas de la columna de la fracción D. ....	34
Tabla 12. Fracciones colectadas de la columna F. ....	35
Tabla 13. Fracciones obtenidas del extracto de metanol parte soluble. ....	37
Tabla 14. Cepas de referencia. ....	38
Tabla 15. Bacterias evaluadas en la segunda prueba microbiológica. ....	44
Tabla 16. CI <sub>50</sub> en µg/ml de las bacterias evaluadas contra los extractos crudos. N/e= no evaluado. ....	62
Tabla 17. CMI en µg/ml de los extractos crudos evaluados con sus controles; Np=no presente, N/e= no evaluado. ....	63
Tabla 18. Significancia de las 10 bacterias evaluadas. ....	63
Tabla 19. resultado de la significancia que se obtuvo de las tres bacterias evaluadas en el segundo ensayo de <i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> y <i>A.a.</i> a. ....	71
Tabla 20. Grupos homogéneos, en orden de significancia A el de mayor significancia y en orden decreciente B, C, D, E. N/E= No evaluado. ....	71
Tabla 21. CMI de la segunda evaluación. ....	72
Tabla 22. CI <sub>50</sub> µg/ml de la segunda evaluación antimicrobiana. ....	72

### 7.3. Listado de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
<i>C. hypoleucus</i>	<i>Croton hypoleucus</i>
<i>L. frutescens</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
<i>P. gingivalis</i> / <i>P. g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i> / <i>P. i.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> / <i>F. n. n.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>Nucleatum</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i> a/ <i>A. a. a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo a
<i>S. mutans</i> / <i>S. m.</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. s.</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>P. micra</i> / <i>P. m.</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>C. gingivalis</i> / <i>C. g.</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>V. parvula</i> / <i>V. p.</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>A. viscosus</i> / <i>A. v.</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ml	Mililitros
µl	Microlitros
µg	Microgramos
Mm	Micrómetros
AAP	Asociación Americana de Periodoncia
CML	Concentración mínima letal
CMB	Concentración mínima bactericida
UFC	Unidades formadoras de colonias
AST	Agar soya tripticasa
HK	Hemina y vitamina K
DO	Densidad óptica
MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de etilo
PSA	Pruebas de susceptibilidad antibacteriana
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
UAEH	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
subsp.	Subespecie
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
°C	Grados Celsius
Fig.	Figura
G	Gramos
DMSO	Dimetil sulfóxido
Nm	Nanómetros
RMN	Resonancia magnética nuclear
ATCC	American Type Culture Collection
MHz	Mega Hertz
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation