



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Evaluación Antimicrobiana *in-vitro* de los extractos
Amelanchier denticulata frente a microorganismos asociados
con Periodontitis”**

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

C.D Erika Alejandra Salinas Peña

Directora de Tesis

Mtra. Martha Mendoza Rodríguez

Co - Directora de Tesis

Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández

San Agustín Tlaxiaca Hidalgo. Agosto de 2019

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 627689.

Y se realizó una estancia de investigación del 1 de marzo al 4 de mayo de 2018, apoyada con una Beca Mixta otorgada por el CONACyT, en Laboratorio de Genética Molecular, de la DEPeI de la Facultad de Odontología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Co-tutoría de la Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández y la asesoría de la Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie.

Parte de este trabajo de investigación fue presentado en las modalidades cartel y/o ponencia de:

La Feria Internacional de la Salud, del 14 al 22 de mayo 2018, con título: “Evaluación antimicrobiana *in-vitro* de los extractos *Amelanchier denticulata* frente a microorganismos identificados en periodontitis crónica” ICSa, UAEH, en Pachuca de Soto, Hgo.

La Semana de las Ciencias Básicas, del 25 al 29 de marzo 2019, con título: “Evaluación antimicrobiana *in-vitro* de los extractos *Amelanchier denticulata* frente a microorganismos asociados con periodontitis” en la Facultad de Odontología, UNAM.

El Congreso Nacional e Internacional de la Facultad de Odontología, UNAM-AMIC del 2 al 4 de mayo de 2019, con título: “Evaluación antimicrobiana *in-vitro* de los extractos *Amelanchier denticulata* frente a microorganismos de la placa dentobacteriana” en WTC de la Ciudad de México.

La Feria Internacional de la Salud, del 22 al 23 de mayo 2019, con título: “Evaluación antimicrobiana *in-vitro* de los extractos *Amelanchier denticulata* frente a microorganismos asociados con periodontitis” en ICSa, UAEH, en Pachuca de Soto, Hgo.

Dedicatorias y agradecimientos

“De eso se trata, de coincidir con gente que te haga ver cosas que tú no ves, que te enseñen a mirar con otros ojos” Mario Benedetti.

Concluir esta etapa profesional se dice fácil, lo que realmente ha implicado es mucho trabajo, esfuerzo, estrés, múltiples desvelos y muchas emociones encontradas, afortunadamente no tuve que recorrer este camino sola.

Agradezco a mi Tutora la Mtra. Martha Mendoza por brindarme su confianza, por darme consejos, por las enseñanzas y también por apoyarme siempre y ser tan optimista aún en los momentos más estresantes, todo esto se suma a mi formación personal y profesional, ha sido un largo trayecto el que iniciamos juntas hace tiempo y sin lugar a duda espero en un futuro seguir compartiendo con usted vivencias, experiencias y trabajo.

A mi Co-tutora la Mtra. Adriana Rodríguez por todos los conocimientos que me ha compartido, por enseñarme de forma personal todos los procesos y técnicas que se realizan en laboratorio, por la paciencia se que al principio no ha sido fácil acostumbrarme al ritmo de trabajo, admiro la pasión que demuestra en su trabajo, agradezco que me exigiera tanto porque si bien me estresaba cometer errores se que de todo aprendí, gracias a ello ahora se que me gustaría en un futuro dedicarme a la investigación.

A la Mtra. Lourdes Márquez por contactarme con la Dra. Laurie y la Mtra. Paty para poder realizar la estancia de investigación en UNAM, sabia que tenia un compromiso doble, el vinculo entre ambas universidades ayuda a crear trabajos de calidad, agradezco las asesorías que han enriquecido el proyecto, por las observaciones y comentarios realizados durante estos dos años.

A la Dra. Laurie Ann Ximénez por recibirme en su casa, usted me comento un día que laboratorio es como su casa y los alumnos somos huéspedes, admiro su trabajo y se que si usted ha sobresalido como investigadora es por todo el esfuerzo que ha realizado, admiro su carácter y su sinceridad, me sentí muy afortunada de conocerla, espero encontrarla nuevamente.

“Al final del día podemos soportar más de lo que creemos”. Frida Kahlo

A la Dra. Claudia Velázquez por sumarse a este proyecto, por explicarme la parte química con tantos ejemplos se que no fue fácil, agradezco su paciencia, tiempo y dedicación durante los últimos meses.

A Leti eres una excelente persona, trabajadora, responsable y muy ordenada, el trabajo que realizas en laboratorio es muy importante, nos haces a todos el trabajo menos pesado, agradezco tu ayuda, paciencia, las charlas y las tazas de café durante toda la estancia.

A mi familia me siento orgullosa de cada uno de ustedes y los amo.

Papá Agustín te agradezco por enseñarme a ser responsable, trabajadora y a no dejarme intimidar cuando no sé las cosas porque tu siempre dices: “Si no sabes algo pues aprendelo” también por enseñarme a no dejar las cosas inconclusas porque otra frase que dices es: “Si empiezas algo terminalo” así que eso es justo lo que hago.

Mamá Teresa te agradezco por estar pendiente de mí, por darme mi espacio cuando llegaba de malas después de un mal día, por sufrirme cuando le contaba cosas que me pasaban, es importante saber que si se cumplió lo que me decías: “Ya casi terminas, aguanta” era real, ha concluido esta etapa profesional.

Mi hermana Sara, mi bebe favorita por aguantar mi mal humor, por ayudarme con las tareas, por acompañarme y esperarme muchas horas cuando tenía que ir a México, te admiro como mujer y como profesionista tienes mucha paciencia, eres muy inteligente y pienso que ver el lado bueno de las personas y de las situaciones como tú lo haces es algo que quiero aprender, recuerdo que un día me dijiste: “Hay una vida allá afuera” cuanta razón tienes, me parece importante siempre recordar esas frase.

Mi hermano Ivan, mi bebe estrella por ser una persona tan inteligente, me ayuda a querer aprender más, te agradezco por enseñarme a no sentirme intimidada por estar en otra ciudad o por conocer profesionistas de otra Universidad, por dejarme quedar en tu depa para no cansarme tanto en viajar, por revisar la tesis en ultimo momento y por salir conmigo aun cuando llegabas super cansado del trabajo, también por escuchar cuando te contaba de la escuela, esa frase que dices es muy cierta “Esta familia nos ha preparado para todo”.

“Si actúas como si supieras lo que estás haciendo, puedes hacer lo que quieras” Amy Winehouse.

Agradezco a mis amigas: Gloria por ser sumamente organizada y disciplinada, me recordaste que debo ser mas organizada y también que existe tiempo para todo, sigo trabajando en ello, Abi por demostrar tanta resistencia a la presión, por tu sinceridad sin duda y tu peculiaridad para decir las cosas, además de tu humor negro y Ena por enseñarme que aún en los peores momentos se debe poner buena cara y tener buena actitud, no sé como le haces enserio pero es una gran virtud. Gracias mujeres por ser parte de esta etapa profesional, por su compañía y opiniones, valoro mucho su amistad y admiro la forma en la que cada una ve la vida, he aprendido mucho de ustedes, las aprecio mucho y espero que el vínculo que hemos creado se fortalezca con el paso de los años.

A mi familia más cercana, agradezco formar parte de su vida y valoro mucho las reuniones, las conversaciones, las bromas y los recuerdos que tenemos juntos y claro a las personas que ya no se encuentran aquí, me hubiese gustado compartir con ustedes este logro, pese a eso su ausencia es y seguirá siendo un impulso para seguir.

A la UAEH por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias Biomédicas y Salud

A la UNAM por ofrecerme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en tan prestigiosa universidad.

A CONACyT por el financiamiento y las becas otorgadas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias de la Salud
 School of Medical Sciences
 Área Académica de Medicina
 Department of Medicine
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud



29/julio/2019
 AAM/MCBS/084/2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Salinas Peña Erika Alejandra
 Alumna de la Maestría 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 Amelanchier denticulata frente a microorganismos asociados con periodontitis" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

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

- | | |
|--------------|---|
| PRESIDENTE | M. en Periodoncia María de Lourdes Márquez Corona |
| PRIMER VOCAL | M. en Ortodoncia Martha Mendoza Rodríguez |
| SECRETARIO | M. en C. Adriana Patricia Rodríguez Hernández |
| SUPLENTE | Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie |
| SUPLENTE | Dra. Claudia Velázquez González |

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



Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
 DIRECTOR

DRA. LYBIA LÓPEZ PONTIGO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
 Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
 Mexico. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 medicina@uaeh.edu.mx

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Antecedentes históricos</i>	5
2.2 Generalidades de las Enfermedades Periodontales	7
2.2.1 <i>Definición</i>	7
2.2.2 <i>Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones peri-implantares.</i>	7
2.3 <i>Microbiota subgingival en salud y periodontitis.</i>	10
2.4 <i>Patogenia de la Periodontitis.</i>	12
2.5 <i>Factores de riesgo modificables y no modificables.</i>	13
2.6 <i>Terapia Periodontal.</i>	14
2.6.1 <i>Higiene profesional</i>	14
2.6.2 <i>Higiene bucal con Fitoterapia.</i>	15
2.8 <i>Amelanchier denticulata.</i>	16
2.8.1 <i>Descripción y distribución geográfica de A. denticulata</i>	17
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
5.1 <i>Objetivo general</i>	19
5.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 <i>Tipo de estudio</i>	20
6.2 <i>Variables de estudio</i>	20
6.3 <i>Criterios de selección</i>	20

6.4	Diseño experimental.....	21
6.5	TÉCNICA DE FITOQUÍMICA	22
6.5.1	Recolección de especie vegetal <i>A. denticulata</i>	22
6.5.1.1	Principio de recolección	22
6.5.1.2	Principio de recolección	22
6.5.1.3	Procedimiento de recolección.....	22
6.5.2	Obtención de extractos de <i>A. denticulata</i>	22
6.5.2.1	Principio para la obtención de los extractos.....	23
6.5.2.2	Procedimiento para la obtención de los extractos	23
6.6	Cromatografía de capa fina.....	23
6.6.1	Principio de TLC	24
6.6.1.1	Principio de TLC	24
6.6.1.2	Procedimiento de TLC	24
6.6.2	Pruebas fitoquímicas preliminares.....	24
6.6.2.1	Principio para las pruebas fitoquímica preliminares	24
6.6.2.2	Procedimiento para las pruebas fitoquímicas preliminares.....	25
6.7	PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	27
6.7.1	Disolución de los extractos	27
6.7.1.1	Principio para la disolución de los extractos	27
6.7.1.2	Principio para la disolución de los extractos	27
6.7.1.3	Procedimiento para la disolución de los extractos	27
6.7.2	Condiciones de cultivo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.	28
6.7.2.1	Principio para las condiciones de cultivo	28
6.7.2.2	Procedimiento para las condiciones de cultivo.....	29
6.7.3	Prueba de toxicidad para Tween 20.....	29
6.7.3.1	Principio para las prueba de toxicidad	29
6.7.3.2	Procedimiento para las prueba de toxicidad.....	30
6.7.4	Prueba piloto	31
6.7.4.1	Principio de la prueba piloto.....	31
6.7.4.2	Procedimiento de la prueba piloto.....	31
6.7.5	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	33
6.7.5.1	Principio de susceptibilidad.....	33
6.7.5.2	Procedimiento de susceptibilidad	33

6.8 Análisis estadístico.....	35
VII. RESULTADOS.....	36
7.1 Pruebas fitoquímicas	36
7.2 Pruebas Microbiológicas.....	37
7.2.1 Resultados de la prueba de toxicidad	37
7.3 Resultados de la Prueba piloto	38
7.4 Resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana	39
VIII. DISCUSIÓN	52
IX. CONCLUSIONES.....	56
X. RECOMENDACIONES	57
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
XIV. ANEXOS	63
12.1 Carta de aceptación para estancia de Investigación.....	63
12.1 Constancias y reconocimientos obtenidos	64
XV. GLOSARIO DE TERMINOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas utilizadas para enfermedades bucodentales	16
Tabla 2. Pesaje de los extractos <i>A. denticulata</i>	23
Tabla 3. Disolución de los extractos a utilizar para las pruebas microbiológicas..	27
Tabla 4. Pruebas fitoquímicas preliminares	37
Tabla 5. Resultados de la Prueba T de Student para muestras relacionadas	40
Tabla 6. Conteo de unidades formadoras de colonia UFC's	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones peri-implantares 2018.....	9
Figura 2. Esquema de sucesión microbiana S. Socransky.....	11
Figura 3. <i>A. denticulata</i>	17
Figura 4. Diagrama de flujo	21
Figura 5. Cepas seleccionadas y referencias de ATCC.....	28
Figura 6. Representación de Prueba de toxicidad de Tween con <i>S. sanguinis</i>	30
Figura 7. Representación de Prueba piloto con <i>S. mutans</i>	32
Figura 8. Representación de Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	34
Figura 9. Representación de compuestos químicos rastreados con TLC	36
Figura 10. Resultados de Prueba de toxicidad de Tween con <i>S. sanguinis</i>	38
Figura 11. Resultados de Prueba piloto con <i>S. mutans</i>	39
Figura 12. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>S. mutans</i>	42
Figura 13. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>S. sanguinis</i>	43
Figura 14. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>A. viscosus</i>	44
Figura 15. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>V. parvula</i>,.....	45
Figura 16. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	46
Figura 17. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>P. micra</i>	47
Figura 18. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>A. actinomycetemcomitans</i> stp. b	48
Figura 19. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>C. gingivalis</i>	49
Figura 20. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>P. intermedia</i>	50
Figura 21. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en <i>P. gingivalis</i>	51

RESUMEN

Comunidades de bajos recursos en el Estado de Hidalgo, México, no cuentan con acceso a terapias periodontales, por lo que utilizan especies de plantas como: *Amelanchier denticulata* (Membrillo) para una terapia periodontal empírica, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue el de evaluar el efecto antimicrobiano *in-vitro* de los extractos *A. denticulata* frente a microorganismos de la placa dental, asociados con periodontitis y caries dental, por medio de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por método de micro dilución en caldo. Se utilizó: técnica de fitoquímica para separar el fruto, la hoja y el tallo de la planta con sistema de reflujo con solventes: hexano-(Hex) y metanol-(MeOH), y sistema de rotaevaporación (40°C) además de la Cromatografía de capa fina-(TLC), empleando los disolventes Hex-AcoEt y cloroformo (CHCl₃/MeOH) ambos en concentración 8:2ml y 1 sistema de revelación de ácido sulfúrico con etanol H₂SO₄, para las pruebas fitoquímicas preliminares se utilizaron distintos disolventes. Se seleccionaron cepas provenientes del ATCC: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*, *Parvimonas micra*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b, *Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum, para la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por técnica de microdilución en caldo, concentraciones de: 30-0.05mg/mL, ajustado con Densidad-óptica-1 (OD1) a 600nm y Crecimiento de Unidades Formadoras de colonia (UFC's). Con la TLC y pruebas fitoquímicas se rastrearon 7 compuestos en H-Hex: saponinas, esteroidales-triterpénicas, taninos y OH fenólicos, antraquinonas, esteroides-triterpenos y cumarinas y: 6 en H-MeOH: saponinas, taninos y OH fenólicos, flavonoides, esteroides y triterpenos. Se determinó como Concentración-Mínima-Inhibitoria (CMI): 15mg/mL, para ambos extractos H-Hex y H-MeOH. Con susceptibilidad para: *Actinomyces viscosus* ($p<0.001$ /NS), *Veillonella parvula* (NS/NS), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ($p<0.01$ / $p<0.001$), *Parvimonas micra* (NS/ $p<0.001$), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp.b. ($p<0.01$ / $p<0.01$), *Capnocytophaga gingivalis* ($p<0.001$ / $p<0.001$), *Prevotella intermedia* ($p<0.01$ / $p<0.05$), *Porphyromonas gingivalis* ($p<0.05$ /NS), susceptibilidad corroborada con crecimientos negativos en agar. La inhibición de *Streptococcus mutans* (NS/NS) y *Streptococcus sanguinis* (NS/NS) fue bacteriostática en ambos extractos a partir de la concentración 0.11mg/mL. Los extractos de *A. denticulata* mostraron efecto bactericida a la CMI 15mg/mL de la Hoja Hex y MeOH (indistintamente) en bacterias consideradas periodontopatógenas de la PDB y muestran efecto bacteriostático en especies más resistentes de *Streptococcus* sp. en concentraciones más bajas.

ABSTRACT

Low-income communities in the state of Hidalgo México, do not have access to periodontal therapies, for that reason, they use vegetable plants such as *Amelanchier denticulata* (Membrillo) as a periodontal therapy unknown. The present study purpose was to evaluate antimicrobial effect in-vitro of *A. denticulata* extracts against microorganisms of dental plaque, using tests by broth dilution method. Phytochemistry technique was used with separation of different aerial plant parts: fruit, leaves, and stem of *A. denticulata*. Reflux technique with solvents: hexane-(Hex) and methanol-(MeOH) evaporated with a rotary vacuum (40°C). Thin-layer chromatography (TLC) using the solvents Hex-AcoEt and chloroform (CHCl₃/MeOH) both concentration 8:2ml and one revelation system of sulfuric acid (H₂SO₄)/ethanol (C₂H₅OH), different solvents were used for preliminary phytochemical tests. Selection of ATCC strains: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*, *Parvimonas micra*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b, *Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum for antimicrobial susceptibility tests, by broth dilution method for 10 extract concentrations (30-0.05mg/mL). Measurement of optical density 600nm (OD600) and aerobically growing bacteria in Trypticase-Soy-Agar for viability confirmation by colony forming units (CFU's). With TLC and phytochemical tests, we had obtained 7 compounds tracked in H-Hex: saponins, steroidal- triterpenes, tannins-OH⁻, phenolic, anthraquinones, steroids-triterpenes and coumarins; and 6 in H-MeOH: saponins, tannins-OH⁻, phenolic, flavonoids, steroids, and triterpenes. OD600 values of positive bacteria controls had compared against concentration's extract (T-Student test). The Minimum-inhibitory-concentration (MIC) of both extracts H-Hex y H-MeOH were: 15µg/mL with antimicrobial effect against *Actinomyces viscosus* ($p < 0.001$ /NS), *Veillonella parvula* (NS/NS), *Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum ($p < 0.01$ / $p < 0.001$), *Parvimonas micra* (NS/ $p < 0.001$), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp.b. ($p < 0.01$ / $p < 0.01$), *Capnocytophaga gingivalis* ($p < 0.001$ / $p < 0.001$), *Prevotella intermedia* ($p < 0.01$ / $p < 0.05$), *Porphyromonas gingivalis* ($p < 0.05$ /NS), susceptibility corroborate with negative inhibition in agar. The inhibition of *Streptococcus mutans* (NS/NS) y *Streptococcus sanguinis* (NS/NS) 0.11mg/mL concentration of both extracts. *A. denticulata* extracts showed bactericide effect with MIC 15mg/mL of the leaves diluted in Hexane and Methanol (indistinct), against periodontal-pathogenic bacteria of dental plaque and both extracts showed bacteriostatic effect against more resistant strains *Streptococcus* sp. in a lower concentration.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina alternativa basada en el uso de plantas medicinales, es una práctica tradicional que no ha desaparecido en nuestro país, la gran diversidad de flora y la amplia riqueza cultural de México, han favorecido el aprovechamiento de distintas especies vegetales con fines medicinales desde épocas prehispánicas, transmitiendo por generaciones, los resultados del uso cotidiano para dar tratamiento a patologías muy particulares como son las infecciosas, en gran parte de las zonas rurales, estos remedios caseros forman parte de nuestra riqueza cultural, los tratamientos tradicionales tienen como base los signos y síntomas de las enfermedades para ser tratados de forma empírica, que es cómo se percibe dentro de nuestra cultura, por lo que, es pertinente reconocer la efectividad de los tratamientos tradicionales, como parte de nuestra cultura.(32)

El presente estudio de investigación, tiene como objetivo evaluar la efectividad antimicrobiana de una especie vegetal conocida popularmente como “membrillo” y nombrada científicamente como *Amelanchier denticulata*, dicha especie crece en el Estado de Hidalgo y los pobladores de algunas localidades como San José Capulines, han utilizado de manera recurrente y empírica, dicha planta como terapia auxiliar para la enfermedad periodontal, buscando como único fin la reducción de signos y síntomas que caracterizan esta enfermedad tales como: inflamación, sangrado, recesión, movilidad dental y halitosis.(1)

En algunas comunidades lejanas de la urbanización, la higiene bucal es deficiente ya que las visitas a la consulta dental son limitadas, provocando que las enfermedades bucodentales evolucionen de forma rápida, especialmente en personas de edad avanzada. Para los habitantes de dichas poblaciones, es necesario buscar alternativas opciones que les permitan resolver o reducir los signos y síntomas que se presentan durante dichas enfermedades. Cuando la periodontitis se encuentra en una fase temprana, puede ser reversible evitando de esta manera consecuencias que implican dolor, afectación en la calidad de vida del paciente y un gasto económico considerable para acceder a un tratamiento bucal profesional, el costo elevado de los tratamientos, es una de las principales causas por la cual las personas se automediquen o abandonen los tratamientos, con lo cual se incrementa el consumo de remedios caseros que involucran plantas.(3)

La terapia periodontal implica un gasto importante en materia de salud. Para las personas que la padecen, involucra tiempo, dinero y tratamientos traumáticos que dependerán de la severidad y progresión de la enfermedad. Al sopesar el costo-beneficio, los pacientes diagnosticados con periodontitis deciden frecuentemente abandonar la terapia periodontal, sin saber las consecuencias que esta decisión conlleva, entre las que se encuentran; pérdida de órganos dentales, alteraciones de la articulación temporomandibular, problemas digestivos que afectan la calidad de vida del individuo.(5) Por tal motivo, el objetivo principal del presente estudio, fue el de evaluar el efecto antimicrobiano *in-vitro* de los extractos *A. denticulata* frente a microorganismos asociados con periodontitis, por medio de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por método de micro dilución en caldo.

II. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes históricos

La herbolaria en México a través de milenios, sigue siendo un recurso de tradición y costumbres mexicanas que ha logrado la conservación y preservación de las plantas medicinales, señaladas como instrumentos brindados por la naturaleza para prevenir, aliviar, sanar o curar determinadas enfermedades de los pueblos indígenas, durante siglos fueron empleadas por curanderos, chamanes o alquimistas, transmitiendo sus conocimientos por generaciones, nuestro país posee una de las floras más abundantes a nivel mundial.(31)

Previo a la conquista española en México, la herbolaria se utilizó para todo tipo de enfermedades. El primer libro del cual se tiene conocimiento es “el Códice de la Cruz-Badiano” escrito en Náhuatl y dibujado a mano por Martín de la Cruz, la traducción a latín fue realizada por Juan Badiano discípulo de Fray Bernardino de Sahagún, en este libro se registraron los remedios curativos utilizados por los Aztecas, describiendo usos, propiedades, características de las plantas y tratamientos contra las enfermedades más comunes existentes en esa época, se incluyeron remedios para heridas, encías inflamadas, quemaduras del cuerpo, fracturas de la cabeza, entre otros. Durante la conquista Hernán Cortés escribió y envió cartas dirigidas al Rey de España, en las cuales describía a los chamanes Aztecas y a la medicina indígena, mencionando el orden anatómico en el que los pueblos indígenas agrupaban las enfermedades de pies a cabeza, así como la aplicación de conocimientos sobre herbolaria y medicina tradicional para curar a los españoles de enfermedades que desconocían.(29)

Para los años setentas, la Medicina tradicional tuvo un importante avance en el estudio y empleo de la herbolaria en el mundo. Este giro provino y fue apoyado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cual reconoció y definió a las hierbas medicinales como medicamentos terminados y etiquetados que contienen ingredientes activos de partes interiores y exteriores de plantas u otras especies vegetales, o la combinación de estas en bruto o como preparaciones para aliviar malestares.(30) Reconociendo con ello que la medicina tradicional para millones de personas, representa

el conocimiento milenario que los indígenas han resguardado. La OMS definió a la medicina tradicional, como la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizadas tanto para mantener la salud como para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales.(31)

Para las comunidades indígenas, las plantas medicinales son de gran importancia en la medicina tradicional, desempeñando un papel importante en la salud. En 1975 en México, se fundó el Instituto Mexicano para el Estudio de las plantas medicinales (IMEPLAN) teniendo como propósito la integración de un grupo de científicos que desarrollaran investigaciones multidisciplinarias de Antropología Médica, Etno-botánica, Fitoquímica y Farmacología experimental para fundamentar científicamente la medicina tradicional indígena mexicana, abriendo camino a la medicina moderna de México, años más tarde se funda el Herbario de Plantas Medicinales, en el que se establecen laboratorios de química y farmacología, en 1980 el IMEPLAN se incorpora al IMSS y para el año 2000 se funda el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y la Unidad de Desarrollo Tecnológico de Fito medicamentos que para el año 2007 desarrolla las primeras patentes de Fito medicamentos a partir de plantas mexicanas.(34)

El 90% de los habitantes en México emplea la herbolaria, promoviendo los conocimientos milenarios utilizados en la medicina tradicional que persisten hasta hoy. Desde el punto de vista taxonómico, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial de plantas medicinales, con un registro de 4500 plantas, de las cuales solo se han estudiado 500. La Comisión Nacional para el conocimiento y usos de la biodiversidad (Conabio) registro 4000 especies con atributos medicinales que equivalen al 15% de la flora total del país, con lo cual se considera que 1 de cada 7 plantas posee alguna propiedad medicinal.(36)

Actualmente se realizan investigaciones de la plantas medicinales, en distintas Instituciones como en la Universidad Autónoma de Chapingo, el Instituto Politécnico Nacional y en algunas facultades de la Universidad Nacional Autónoma de México. En nueve hospitales de la Secretaria de Salud en los Estados de Durango, Nayarit, Oaxaca,

Puebla y Chiapas cuenta con dos farmacias de alopátia y de medicina tradicional indígena con curanderos que recetan herbolaria que ellos mismos preparan.(32)

2.2 GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

2.2.1 Definición

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial crónica, asociada a la biopelícula compuesta de placa disbiótica, y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte dental. Sus características principales incluyen: la pérdida de soporte del tejido periodontal, que se manifiesta a través de la pérdida de inserción clínica, la pérdida ósea alveolar evaluada radiográficamente, la presencia de bolsas periodontales y el sangrado gingival.(19)

2.2.2 Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones peri-implantares.

En la clasificación más actual de las enfermedades y condiciones periodontales, establecida por la Academia Americana de Periodontología y la Federación Europea de Periodontología, de acuerdo con los conocimientos actuales sobre fisiopatología, se pueden identificar tres formas de periodontitis: periodontitis necrotizante, periodontitis y periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas (ver figura 1).(57) Las formas de periodontitis "crónica" o "agresiva" de la clasificación de Armitage de 1999 (5) dejan de referirse. A continuación, se describen las formas de Periodontitis en la clasificación actual:

1. Enfermedades Periodontales Necrotizantes:

- a. Gingivitis Necrotizante
- b. Periodontitis Necrotizante
- c. Estomatitis Necrotizante

2. Periodontitis:

a. Estados basados en severidad y manejo de complejidad

- I. Estadio: Periodontitis inicial.
- II. Estadio: Periodontitis moderada.
- III. Estadio: Periodontitis severa con potencial con potencial de pérdida dental adicional.
- IV. Estadio: Periodontitis severa con potencial de pérdida de la dentición.

a. extensión y distribución: localizada; generalizada; distribución incisivo-molar

c. grados: evidencia o riesgo de progresión rápida, respuesta anticipada al tratamiento.

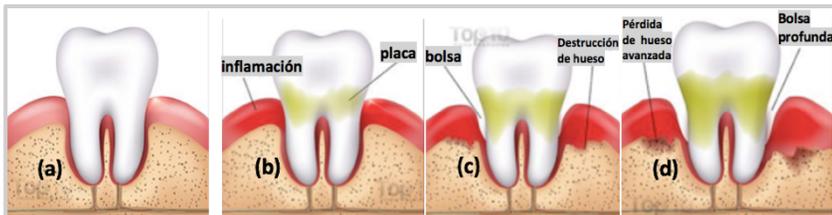
- grado a: tasa lenta de progresión.
- grado b: tasa moderada de progresión.
- grado c: tasa rápida de progresión.(57)

3. Periodontitis como Manifestación de Enfermedades Sistémicas:

La clasificación de estas condiciones debe estar basada en la enfermedad sistémica primaria de acuerdo con la clasificación estadística de enfermedades y códigos de problemas de salud relacionados (ICD).

Figura 1. Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones peri-implantares 2018.

Condiciones y Enfermedades Periodontales										
Salud Periodontal, Enfermedades y Condiciones Gingivales			Periodontitis			Otras condiciones que afectan el Periodonto				
Salud Gingival y salud Periodontal (a)	Gingivitis: inducido-biopelícula dental (b)	Enfermedades Gingivales: no inducidas-biopelícula dental	Enfermedades Periodontales Necrotizantes	Periodontitis (c, d)	Periodontitis como una manifestación de enfermedades sistémicas	Enfermedades sistémicas o condiciones que afectan los tejidos de soporte periodontal	Absesos periodontales y lesiones Endodóntico-Periodontales	Deformaciones y condiciones Mucogingivales	Fuerzas oclusales traumáticas	Factores Relacionados con Prótesis y dientes



En la figura 1. se describe la clasificación más actual de Condiciones y Enfermedades Periodontales, agrupadas en tres grandes rubros: salud periodontal figura (a), gingivitis en la figura (2) y periodontitis en las figuras (c y d) y otras condiciones que afectan el periodonto. Cada una de ellas se subclasifican a su vez, de acuerdo con la posible etiología.(57)

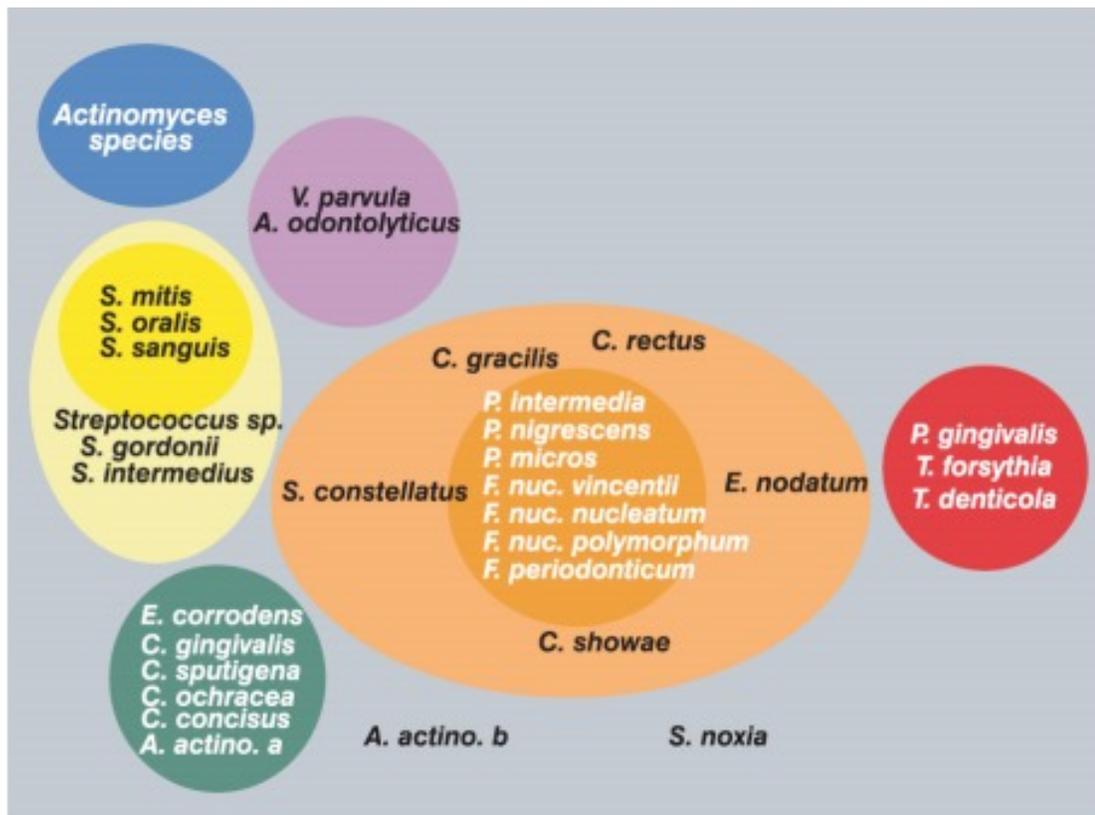
2.3 Microbiota subgingival en salud y periodontitis.

Los microorganismos y la presencia de un hospedador susceptible son factores necesarios para el desarrollo de la enfermedad periodontal, la cantidad y el tipo de bacterias agrupadas en el biofilm subgingival son esenciales para el inicio y la progresión de la enfermedad.(6)

En el esquema de sucesión microbiana de la placa dentobacteriana subgingival, realizado por S. Socransky y col. (figura 2)(1) describe las asociaciones entre especies bacterianas que colonizan la placa subgingival y sus distintos tipos de colonización, las asociaciones son descritas por colores en complejos bacterianos de la siguiente manera:

- complejo de especies de *Actinomyces* excepto *Actinomyces odontolyticus*.
- complejo amarillo: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*.
- complejo morado: *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula*.
- complejo verde: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. a, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochraceae*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus* y *Eikenella corrodens*.
- complejo naranja: *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum, *Fusobacterium nucleatum* subsp. polymorphum, *Fusobacterium nucleatum* subsp. vincentii, *Fusobacterium periodonticum*, *Parminonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus* y *Eubacterium nodatum*.
- complejo rojo: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*.
- Especies no agrupadas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b y *Selenomonas noxia*.

Figura 2. Esquema de sucesión microbiana de S. Socranksy 1998.



Representación de la asociación de especies bacterianas de la placa dentobacteriana subgingival por complejos bacterianos. Las especies de los complejos de: *Actinomyces* sp., amarillo, morado y verde son consideradas “colonizadoras primarias” o especies compatibles con salud periodontal, las del complejo naranja son consideradas “colonizadoras puente” o especies patógenas putativas y el complejo rojo está compuesto por especies “colonizadoras tardías” o periodonto patógenas reconocidas.(2, 60)

Entre el grupo de bacilos anaerobios Gram negativos, se encuentran las especies: *P. intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* conocidas como patógenos putativos de la biopelícula. La especie mayormente asociadas con periodontitis de inicio precoz es: *A. actinomycetemcomitans* stp. b, que son cocos Gram negativos y *P. gingivalis* bacilo Gram negativo anaerobio, es el patógeno reconocido más estudiado en distintos tipos de periodontitis.(3) Estas dos últimas especies se encuentran presentes en proporciones bajas en el periodonto sano, sin embargo, su incremento en cantidad altera la homeóstasis de la biopelícula, favoreciendo el desarrollo de las enfermedades periodontales.(44)

El primer estudio descriptivo de la placa dentobacteriana subgingival, realizado en una población mexicana con periodontitis crónica y una población periodontalmente sana, fue realizado por Ximenez-Fyvie y col., en el cual describieron y compararon la microbiota supragingival con distintas condiciones periodontales, dónde evaluaron 40 especies bacterianas. Las diferencias principales que se observaron entre grupos de estudio, fueron que las especies bacterianas compatibles con salud periodontal incluyen miembros de los géneros: *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella*, mientras que especies de los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Tannerella* son detectadas en mayor proporción en sujetos con periodontitis.(16)

2.4 Patogenia de la Periodontitis

Las enfermedades periodontales son caracterizadas por desafíos bacterianos que pueden instigar respuestas inmunológicas destructivas en el huésped, lo que conduce a activación de líneas celulares de destrucción ósea y con ello a pérdida ósea y de tejido conectivo. El grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana se ve influenciado principalmente por la presencia y el aumento en número y proporción de bacterias consideradas como periodontopatógenas (Socransky 2005), sin embargo, el proceso de destrucción de los tejidos periodontales es el resultado de la combinación de diversos factores como pueden ser los efectos tóxicos de los linfocitos, neutrófilos y macrófagos, lo cual puede dar como resultado mecanismos de defensa incapaces de eliminar algunos agentes infecciosos bacterianos.(58)

Durante el desarrollo de la enfermedad periodontal, se presenta inflamación del tejido conectivo y epitelial que provoca trasudación de líquido crevicular, exudado gingival que influye en la distribución y el metabolismo microbiano de la cavidad bucal, los carbohidratos permitirán el desarrollo de microorganismos acidógenos y acidúricos, el fluido gingival aumenta en presencia de un cuadro inflamatorio, la presencia de albumina, glucoproteínas, lipoproteínas, sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfatos inorgánicos, hemina M y alfa 2-globulina son elementos necesarios para el desarrollo de las bacterias subgingivales, todos estos elementos son necesarios para crear un medio ambiente propicio, así como el desarrollo de microorganismos en el surco gingival, el aumento en

cantidad de bacterias subgingivales esta relacionado con la progresión y severidad de la periodontitis.(1,4)

2.5 Factores de riesgo modificables y no modificables

La Periodontitis es una infección de carácter endógeno, que afecta a los tejidos de soporte del diente, el principal factor etiológico es microbiano sin embargo existen factores de riesgo ambientales modificables y no modificables (59), algunos ejemplos son:

- la higiene bucal deficiente que involucra la susceptibilidad del hospedero, la presencia de cálculo dental, caries, restauraciones desajustadas, apiñamiento dental, dieta rica en azúcares, desnutrición.(39)
- el medio ambiente local, la adhesión bacteriana, la alteración del pH en boca y la cantidad de saliva segregada, los cuales promueven el proceso patológico.(40)
- el tabaquismo, que es un factor de riesgo que ocasiona la pérdida de inserción dental y del hueso alveolar, las toxinas encontradas en el cigarro inducen la inflamación de mucosas y modifican el hospedero creando un medio susceptible para el desarrollo de la enfermedad.(40)

Entre los factores de riesgo no modificables se encuentran la raza, el sexo, la edad o la genética y los factores sistémicos presentes en condiciones médicas como;(59)

- las variaciones polimórficas genéticas que afectan la respuesta inmunológica de un individuo ante una infección periodontal, afectando la capacidad de defensa ante la enfermedad.(37)
- la virulencia bacteriana con la cual los patógenos secundarios pueden mejorar o apoyar la virulencia, facilitando la sinergia y la transición de patogenicidad.(49)
- las enfermedades sistémicas como diabetes que ocasiona xerostomía (disminución de la cantidad de saliva), las enfermedades cardiovasculares, el EPOC, las enfermedades renales, la artritis reumatoide y el cáncer afectan los tejidos blandos de la cavidad oral.(37)

2.6 TERAPIA PERIODONTAL

2.6.1 Higiene profesional

Los individuos que presentan periodontitis, presentan signos y síntomas visibles como enrojecimiento gingival y sangrado, halitosis, en algunos casos dolor al ocluir (derivado de la movilidad dental) y sensibilidad dental como consecuencia de la denudación de la raíz por recesiones gingivales, motivando al paciente a tener un primer acercamiento con el odontólogo general y/o la canalización con un especialista en periodoncia, con lo cual se da inicio a la terapia periodontal que engloba tres fases o tratamientos:(48)

- Fase 1 (tratamiento no quirúrgico): incluye una fase higiénica, el control de placa dentobacteriana, la técnica de cepillado, la utilización de auxiliares de limpieza como hilo dental, dentífricos y colutorios dentales especiales que contengan clorhexidina al 0.12%, la odontoexcesis y profilaxis.(48)
- Fase 2 (tratamiento quirúrgico): puede incluir uno o varios procedimientos que van desde la reducción de las bolsas periodontales, el tratamiento consiste en la eliminación de la pared interna de la bolsa, el curetaje cerrado o abierto, el raspado y alisado radicular, la cirugía de colgajo, la gingivectomía, la cirugía receptiva ósea en la que se realiza una remodelación de los márgenes óseos, la regeneración tisular guiada de injertos y membranas.(48)
- Fase 3 (mantenimiento): revisiones periódicas con el periodoncista que dependerán de la evolución y severidad de la enfermedad con un mínimo de una sesión cada 6 meses.(45)

El auxiliar de limpieza para reducir carga bacteriana, más recomendados por los odontólogos generales y los especialistas, son los colutorios dentales que contienen distintos ingredientes o compuestos químicos como es el gluconato de clorhexidina, que actúa como antimicrobiano. Otros colutorios incluyen ingredientes como: triclosán, cloruro de zinc, vitamina E, xilitol y aceites esenciales con una mezcla de compuestos fenólicos y metilsalicilato, compuestos que ofrecen ventajas como su fácil uso y

desventajas con el efecto reducido en la placa subgingival, limitando su eficiencia, el costo elevado y como consecuencia, del uso prolongado se presentan efectos secundario como pigmentación dental, deterioro del esmalte dental, irritación de mucosas, atrofia de papilas gustativas que puede ocasionar alteraciones en el sentido del gusto.(45)

2.6.2 Higiene bucal con Fitoterapia

Los hábitos bucales personales contribuyen como terapia para mejorar la salud periodontal. La utilización empírica de especies vegetales, es reconocida como agente de salud en diversas culturas. Han sido transmitidos como remedios caseros, por generaciones con el nombre de Fitoterapia. Los principios activos de determinadas plantas se han utilizado en la industria farmacéutica llevando a cabo previamente ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan explicar de forma racional su uso terapéutico.(14)

Existen especies vegetales que son utilizadas como plantas medicinales se estima que entre 3000 a 5000 especies vegetales reciben algún uso medicinal en nuestro país, la mayoría de las plantas medicinales, se venden en los mercados y son utilizadas por amplios sectores de la población mexicana, retomado de esta forma la medicina tradicional, siendo en ocasiones el principal o único recurso al cual pueden acceder para recuperar la salud.

En el área de odontología el total de especies vegetales identificadas con propiedades terapéuticas es de 343 especies empleadas de forma general para distintas enfermedades bucales mientras que existen de forma específica 49 especies utilizadas para tratar las enfermedades periodontales, esta información nos aporta antecedentes respecto al uso de distintas especies vegetales que durante años se han utilizado las plantas medicinales para tratar distintas afecciones bucodentales de acuerdo los usos y costumbres. En la tabla 1 se presenta un listado de plantas a las que se les atribuyen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antimicrobianas y antifúngicas descritas en investigaciones previas y actuales: (12,14, 18, 20, 36, 35)

Tabla 1. Plantas utilizadas para enfermedades bucodentales.

Nombre científico	Nombre común	Uso principal en enfermedades bucales
<i>Polyginum aviculare</i> (12)	sanguinaria	Gingivitis.
<i>Croton lecheri</i> (20)	sangre de drago	Analgésico, antimicrobiano, antiinflamatorio y periodontopatías.
<i>Amphiterygium adstringens</i> (14)	cuachalate	Periodontopatías.
<i>Persea americana miller</i> (20)	aguacate	Gingivitis y periodontitis
<i>Allium savitum</i> (18)	ajo	Candidiasis, antibiótico.
<i>Sizygium aromaticum</i> (18)	clavo de olor	Odontalgias, alveolitis.
<i>Menta piperita</i> (20)	menta	Anticariogénico, antiinflamatorio, periodontopatías.
<i>Urtica dioica</i> (14)	ortiga	Astringente en periodontopatías.
<i>Thymus vulgaris</i> (14)	tomillo	Odontalgias e inflamación del periodonto.
<i>Theobroma cacao</i> (20)	cacao	Bacteriostático para <i>Streptococcus mutans</i> .
<i>Mangifera indica</i> (18)	mango	Disminución de niveles séricos en periodontitis.
<i>Rosmanirus officinales</i> (36)	romero	Inhibitorio de <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus acidophilus in-vitro</i> .
<i>Salvia officinales</i> (36)	salvia	Prevención y tratamiento de gingivitis.
<i>Quercus ilex</i> (20)	encino	Periodontopatías.

2.8 Amelanchier denticulata

Pertenece a la familia *Rosaceae*, su nombre científico es *Amelanchier denticulata* o *Malacomeles denticulata*, se conoce como duraznillo, madronillo, membrillo cimarrón, acebuche, granjenillo, manzanita, mimbre y membrillo loco, en las lenguas indígenas es conocida como: tlaxistle tlaxisqui, tlaxioqui, tomistlacatli, tlachistle. La especie que se distribuye en el Estado de Hidalgo, en el Municipio Mineral del Chico, localidad San José Capulines, es utilizada en la medicina tradicional como planta medicinal. Las comunidades refieren su uso frotando contra los dientes, ayudando a desinflamar la encía y disminuir la movilidad dental.(9, 53)

2.8.1 Descripción y distribución geográfica de *A. denticulata*

La planta se encuentra distribuida en tres regiones eco-climáticas; dos son frías con un contraste de humedad y la tercera presenta condición cálida y húmeda, se encuentra distribuida en pastizales y matorrales a temperaturas mínimas y máximas anuales entre 14 y 19°C, puede medir de 1 a 3 m de altura, sus hojas de 1 a 2.5 cm de largo son enteras o dentadas con puntas redondeadas y vellosas por debajo, posee flores blancas y frutos de color rojo claro con pulpa blanca de 8 a 10 mm de longitud, con 4 semillas de 0.4 a 0.5 cm de largo, destacan características como su crecimiento lento, tolerancia a sequías, desarrollo en suelos calizos, arcillosos, arenosos y bien drenados, son utilizadas ornamentalmente y contienen pectina (son propiedades gelatinizantes, espesantes y estabilizantes de gran importancia en la industria cosmetológica, farmacéutica, textil y siderúrgica)(figura 3).(9, 53)

Figura 3. *Amelanchier denticulata*.



Fotografía (a): especie vegetal, que muestra cómo se encuentra distribuida en forma de matorral y; fotografía (b) se observa de forma más cercana como está conformada por tallo, hoja, frutos rojos y flores blancas.(53)

III. JUSTIFICACIÓN

La periodontitis es un problema de salud pública mundial, ocupa el segundo lugar como enfermedad bucodental más frecuente, afectando entre el 15 y 20% de la población de edad adulta entre los 35 y 44 años, el incremento del gasto en materia de salud que implica la terapia periodontal, las terapias traumáticas, los tratamientos prolongados y el uso indiscriminado de terapias antimicrobiana han ocasionado resistencia bacteriana como consecuencia del uso prolongado de antimicrobianos locales y sistémicos para tratar las enfermedades periodontales. La importancia de realizar el primer estudio *in-vitro* de la especie *A. denticulata* es brindar nuevas alternativas naturales para el tratamiento de la periodontitis, tomando en cuenta que México es un país con una de las floras más abundantes a nivel mundial y retomando la riqueza cultural de la medicina tradicional que involucra la utilización empírica de especies vegetales como la mencionada con anterioridad ha surgido la siguiente pregunta de investigación: ¿Los extractos de *A. denticulata* tendrán efecto antimicrobiana *in-vitro* frente a microorganismos asociados con periodontitis?

IV. HIPÓTESIS

Los extractos hoja hexano y hoja metanol de *Amelanchier denticulata* tendrán efecto antimicrobiano *in-vitro* frente a especies de la placa dentobacteriana relacionados con periodontitis como: *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. micra*, *A. actinomycetemcomitans* stp. b, *C. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. gingivalis* y con caries dental: *S. mutans*, *S. sanguinis*, *A. viscosus*, *V. parvula*,.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluación del efecto antimicrobiano *in-vitro* de los extractos *A. denticulata* frente a microorganismos de la placa dental, asociados con periodontitis y caries dental, por medio de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por método de micro dilución en caldo.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in-vitro* de los extractos *A. denticulata* por medio de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) por método de micro dilución en caldo.
- Determinar la CMI de distintos extractos de *A. denticulata*, sobre cepas bacterianas representativas de la placa dentobacteriana: *S. mutans*, *S. sanguinis*, *A. viscosus*, *V. parvula*, *F. nucleatum subsp. nucleatum*, *P. micra*, *A. actinomycetemcomitans* stp. b, *C. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. gingivalis* por medio de distintas micro diluciones en caldo.
- Determinar crecimientos bacterianos positivos por medio de cepas control, ajustadas a Densidad Óptica 1 (OD1) y hacer comparaciones de cada crecimiento con los controles por medio de la prueba paramétrica T de Student con ajuste de comparaciones múltiples.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Diseño experimental cuantitativo. Se analizó la especie vegetal *A. denticulata*, de la cual se obtuvieron nueve extractos que fueron preparados para realizar pruebas de susceptibilidad de 10 especies bacterianas, para determinar su actividad antimicrobiana *in-vitro*.

6.2 Variables de estudio

- 1) Especie vegetal *A. denticulata*
- 2) Diez cepas bacterianas de la placa dentobacteriana.

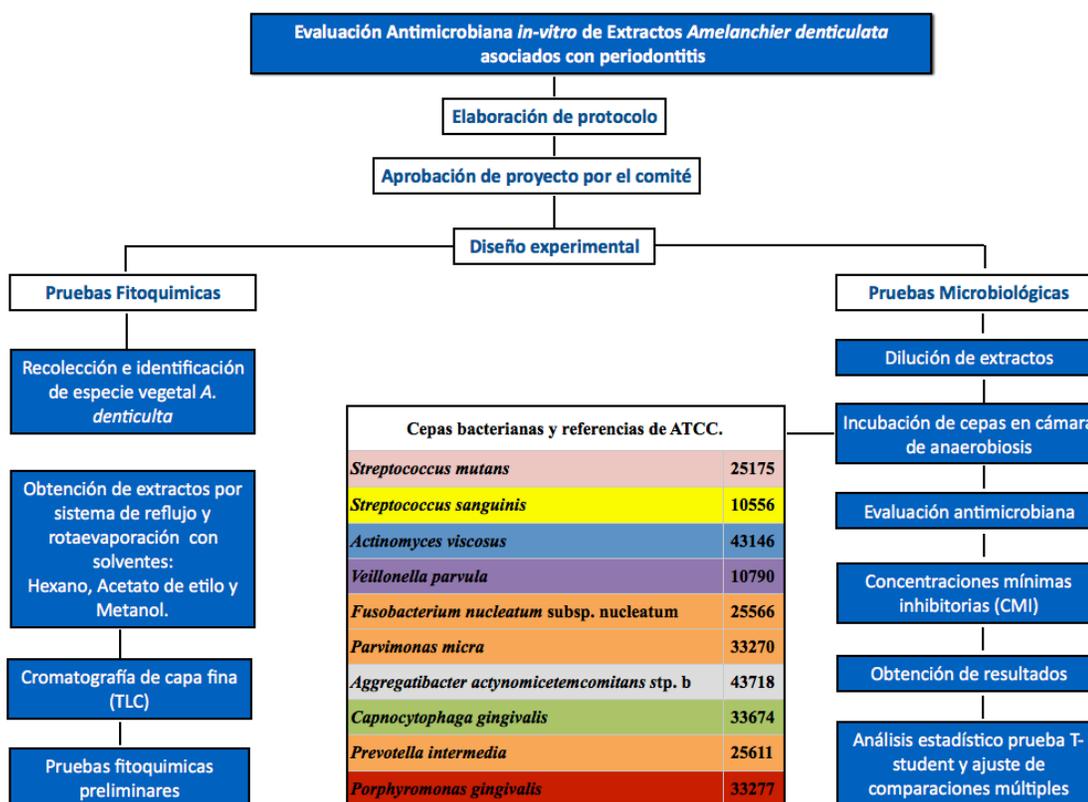
6.3 Criterios de selección

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
1) Extractos de <i>A. denticulata</i> (fruto, hoja y tallo).	Hojas maltratadas y planta comida por insectos. Extractos con bajas o nulas propiedades antibacterianas en la prueba piloto.
2) Cepas provenientes del ATCC: <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>V. parvula</i> , <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> , <i>P. micra</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> sp. b, <i>C. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>P. gingivalis</i>	Contaminación de los pozos control en cultivo de 96 pozos Crecimiento negativo en los controles positivos en cultivos de 96 pozos.

6.4 Diseño experimental.

En la figura 4, se presenta el diagrama que describe el diseño experimental del presente estudio. El estudio comprendió dos técnicas básicas, la primera fue la de Fitoquímica: con la cual obtuvimos los extractos vegetales; y la segunda con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (pruebas Microbiológicas): con la cual obtuvimos las CMI derivadas de las pruebas de susceptibilidad antibacteriana en micro dilución en caldo, con la cual realizamos un análisis de comparativo con la prueba paramétrica T de Student, con ajuste de comparaciones múltiples.

Figura 4. Diagrama de flujo. Diseño experimental para el análisis de datos del estudio.



TLC: cromatografía de capa fina, pruebas fitoquímicas preliminares CMI: concentración mínima inhibitoria, T de Student: prueba para muestras relacionadas paramétricas con ajuste de comparaciones múltiples.

6.5 TÉCNICA DE FITOQUÍMICA

6.5.1 Recolección de especie vegetal *A. denticulata*.

La recolección de la especie vegetal *A. denticulata* se realizó con ayuda de pobladores de la comunidad, durante los meses junio-agosto de 2017 en el Municipio de Mineral del Chico, localidad San José Capulines.

6.5.1.2 Principio de recolección

El ejemplar fue identificado previamente por el Licenciado en Biología y Maestro en Ciencias Miguel Ángel Villavicencio Nieto, Profesor investigador titular A, con líneas de investigación en Etnobotánica, autor de distintas publicaciones.

6.5.1.3 Procedimiento de recolección

El fruto, la hoja y el tallo de *A. denticulata* fueron recolectados, separados y extendidos sobre papel periódico, dejándolos secar a temperatura ambiente, continuamente se cambió el papel evitado así la formación de hongo por humedad, al pasar 4 semanas se pesaron.

6.5.2 Obtención de extractos de *A. denticulata*.

Los solventes utilizados para la obtención de los nueve extractos fueron: hexano (Hex), acetato de etilo (AcoEt) y metanol (MeOH). En la tabla 2 se describen las combinaciones de cada parte vegetal, con cada uno de los solventes seleccionado de acuerdo a su polaridad asegurando con ello mejor arrastre de compuestos químicos.

Tabla 2. Pesaje de los extractos *A. denticulata*.

Parte vegetal	Solvente	Peso inicial	Peso final	Rendimiento
Fruto	Hexano	248.54g/1.900L	44.01g	17.70g
	Acetato de etilo	248.54g/1.900L	22.07g	8.87g
	Metanol	248.54g/1.900L	138.46g	55.70g
Hoja	Hexano	292.11g/1.900L	40.45g	13.84g
	Acetato de etilo	292.11g /1.900L	40.34g	13.80g
	Metanol	292.11g /1.900L	99.97g	34.22g
Tallo	Hexano	345.23g/1.900L	18.19g	5.13g
	Acetato de etilo	345.23g /1.900L	18.19g	5.26g
	Metanol	345.23g /1.900L	68.81g	19.93g

6.5.2.1 Principio para la obtención de los extractos

Las partes de *A. denticulata* se trituraron utilizando una trituradora de grano Hamilton Beach y para el tallo se utilizaron tijeras, posteriormente se almacenaron en tres bolsas herméticas etiquetadas con las partes de la especie vegetal.

6.5.2.2 Procedimiento para la obtención de los extractos

Se pesaron 248.54g. de fruto, 292.11g. de hoja y 345.23g de tallo a los cuales se les agrego 1.900mL de hexano posteriormente se realizó el sistema de reflujo a 90°C durante 6 horas por duplicado, al concluir este sistema se procedió a la eliminación del disolvente por rota evaporación a 40°C, el sistema de reflujo se repitió con dos disolventes más, acetato de etilo a temperatura de 77.1°C y metanol a temperatura de 64.7°C. Finalmente se obtuvieron los nueve extractos y se depositaron por separado en frascos ámbar etiquetados previamente con el nombre de la parte, el solvente utilizado y el peso final obtenido.

6.6 Cromatografía de capa fina

La TLC o cromatografía de rastreo, es una prueba de cualitativa realizada en una placa de silica sobre aluminio con medidas 5x5 con la cual se identifican y separan los compuestos químicos que se encuentren en los extractos a evaluar.

6.6.1 Principio de TLC

La TLC permite detectar e identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas, conformada por una la fase móvil con disolventes seleccionados según la polaridad de la muestra y la fase estacionaria material en donde se trabaja con capilares, papel o laminas con silica.

6.6.1.2 Procedimiento de TLC

La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó utilizando placas de silica sobre aluminio, se utilizaron 12 placas con disolventes distintos, Hex: AcoEt en proporción 8:2, AcoEt 100%, AcoEt: MeOH en proporción 8:2 y Cloroformo: MeOH en proporción 8:2, para determinar si la muestra es polar, el resultado es positivo si la muestra se queda pegada en la línea de siembra y en el caso de una muestra no polar la muestra correrá por la placa, para observar mejor las muestras se revisaron con luz UV y fueron marcadas con un recuadro, después se les coloco revelador H_2SO_4 (Ac. sulfúrico con etanol) y se observaron en la plancha de calentamiento a $80^\circ C$, está prueba nos ayudó a determinar la cantidad de compuestos que pertenecen a cada extracto, se realizó una segunda prueba con los extractos H- Hex, F-AcoEt y H-MeOH, cada extracto se sembró por cuadruplicado, se utilizaron 4 reveladores; sulfato sérico, ácido sulfúrico, vainillina y draggo (Draguendoff).

6.6.2 Pruebas fitoquímicas preliminares

Son pruebas químicas que indicaron la presencia o ausencia de metabolitos secundarios, distribuidos en diferentes grupos taxonómicos y que presentan propiedades biológicas y funciones ecológicas, han sido utilizados como medicamentos, insecticidas, perfumes y colorantes, además han sido denominados productos naturales.

6.6.2.1 Principio para las pruebas fitoquímica preliminares

Al realizar las pruebas fitoquímicas se determinó de forma preliminar la presencia o ausencia de alcaloides, saponinas (esteroidales y triterpenoides), taninos y OH fenólicos, antraquinonas, flavonoides, chalconas y auronas, esteroides y triterpenos y cumarinas.

6.6.2.2 Procedimiento para las pruebas fitoquímicas preliminares

Para las pruebas fitoquímicas se utilizaron viales etiquetados con el nombre de la prueba, a cada vial se les agregó con una micro espátula el extracto H-Hex y H-MeOH depositando una pequeña porción en el fondo, asignándoles un control al cual se le agregaron 2mL de etanol para posteriormente comparar.

- Alcaloides: a los viales con el extracto H-Hex y H-MeOH se le pipeteo 1mL de ácido clorhídrico (HCl) al 1% posteriormente se les agregaron 2 gotas del reactivo Dragendorff. Se observa resultado positivo cuando el precipitado es pardo- naranja.
- Saponinas: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se pipetearon 2mL de agua destilada, posteriormente se calentó en baño maría durante 10 minutos, se dejó enfriar y se agito por 30 segundos. el resultado es positivo para saponinas si se observa presencia de espuma con altura de 0.8 a 1 cm durante 2 minutos.
- Reacción de Lieberman Bouchard: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les agregaron 2 gotas de anhídrido acético ($C_4H_6O_3$) y 2 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. el resultado para saponinas esteroidales es positivo si la coloración es azul o verde. cuando el resultado es positivo para saponinas triterpenoides la coloración es rosa, rojo, magenta o violeta.
- Taninos y OH fenólicos: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les pipeteo 1mL de agua destilada y 1mL de Cloruro férrico ($FeCl_3$) al 1% acuoso. el resultado es positivo para taninos y OH fenólicos cuando se observa: 1 OH coloración amarilla, 2 OH coloración verde (catecil), 3 OH⁻ azul negro (ácido gálico).
- Antraquinonas: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les pipetearon 3 mL de HCl al 10% posteriormente se calentó durante 30 minutos, se dejó enfriar y se extrajo con éter, a la fracción etérea se le pipetearon 2 mL de Hidróxido de sodio NaOH al 10%. El resultado es positivo si se observa color rojo en la interfase.

- Flavonoides (reacción de Schinoda): a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les pipetearon 0.2mL de HCl concentrado, 0.2mL de alcohol amílico y 2 mL de agua destilada. El resultado es positivo para flavonas si la coloración es roja, para flavonoles la coloración es rojo-crimson y para flavononas la coloración es crimson-magenta.
- Reacción de NaOH: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les agregan 3 gotas de NaOH al 10%. El resultado es positivo para xantonas y flavonas si se observa coloración de amarillo a rojo, para chalconas la coloración es de púrpura a rojizo y para antocianinas la coloración es azul. El resultado es positivo para xantonas y flavonas si se observa coloración de amarillo a rojo, para chalconas la coloración de púrpura a rojizo y para antocianinas la coloración es azul.
- Chalconas y auronas: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les pipetearon 2mL de HCl concentrado. El resultado es positivo si se observa de color rojo.
- Esteroides y triterpenos (Prueba de Liebermann-Burchard): a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les pipeteo 1mL de (C₄H₆O₃) y 1mL de cloroformo (CHCl₃) con volumen igual, se deja enfriar a 0°C en baño de hielo y por las paredes se agrega 1 gota de (H₂SO₄) se enfría nuevamente a 0°C. El resultado es positivo para esteroides cuando se observa coloración verdeazulada y positivo para triterpenos cuando la coloración es rojo-naranja.
- Cumarinas: a los viales con los extractos H-Hex y H-MeOH se les pipetearon 5mL de agua destilada y se cubrió con papel filtro humedecido con NaOH al 10% sujetando el papel con una banda elástica posteriormente se deja en baño maría durante 5 minutos, se deja enfriar y se retira el papel filtro para observarse con luz UV. el resultado es positivo cuando la fluorescencia en el papel filtro es de color verde, amarilla o rosa.

6.7 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

6.7.1 Disolución de los extractos

Procedimiento realizado para seleccionar la disolución más efectiva al mezclar los nueve extractos con las soluciones hasta que sus partículas queden mezcladas e incorporadas con la solución.

6.7.1.2 Principio para la disolución de los extractos

Determinación de las soluciones ideales para lograr la disolución de los nueve extractos, utilizando inicialmente ddH₂O, etanol al 99%, y Tween 20 a distintas concentraciones. Se determinó que el Tween 20 al 0.01% presentó mejor disolución.

6.7.1.3 Procedimiento para la disolución de los extractos

Para lograr la disolución de los extractos, se realizaron pruebas de solubilidad de las distintas partes vegetales, con los siguientes diluyentes: ddH₂O, etanol al 99%, y Tween 20, se pesaron y vertieron 100mg de cada uno de los nueve extractos por separado en crioviales y se almacenó 1mL de cada diluyente y se determinó como mejor diluyente: Tween 20 a la concentración al 0.01%: 3mL Tween 20 /30mL de ddH₂O. Las disoluciones a utilizar se observan en la Tabla en la que se pesaron 300mg de cada uno de los extractos y se vertieron 10mL de tween 20 concentración 0.01% respectivamente (tabla 3). Partes de *A. denticulata* F: fruto, H: hexano, T: tallo y solventes Hex: hexano, AcoET: acetato de etilo y MeOH: metanol

Tabla 3. Disolución de los extractos a utilizar para las pruebas microbiológicas

Código	disolución de Extractos
F-Hex	F 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
F-AcoEt	F 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
F-MeOH	F 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
H-Hex	H 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
H-AcoEt	H 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
H-MeOH	H 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
T-Hex	T 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
T-AcoEt	T 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%
T-MeOH	T 300mg/10mL Tween 20 al 0.01%

6.7.2 Condiciones de cultivo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Las bacterias seleccionadas para la realización del experimento incluyeron cepas representativas de la placa dentobacteriana: colonizadoras tempranas, colonizadoras puente y colonizadoras tardías, con excepción de *S. mutans*, que se incluyó por ser una cepa resistente, colonizadora primaria con propiedades de adhesión al diente (figura 5).

Figura 5. Cepas bacterianas y referencias de ATCC.

Cepas bacterianas y referencias de ATCC.	
<i>Streptococcus mutans</i>	25175
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146
<i>Veillonella parvula</i>	10790
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	25566
<i>Parvimonas micra</i>	33270
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> stp. b	43718
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33674
<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277

Subsp.: subespecie; stp.: serotipo; ATCC (American Type Culture Collection), Rockville, MD.

El medio de cultivo fue determinado de acuerdo con el requerimiento de cada cepa seleccionada para lograr el crecimiento bacteriano más favorecedor, las condiciones fueron de anaerobiosis con inclusión de CO² para las especies capnofílicas, la temperatura se mantuvo en un rango de 35-35.5°C, con humedad del 10%, para su propagación en los tiempos de incubación establecidos para cada experimento.

6.7.2.1 Principio para las condiciones de cultivo

Las cepas fueron rehidratadas en caldo de Infusión Cerebro Corazón (ICC) y cultivadas en agar enriquecido (17g - Trypticaseína agar base, 5ml - solución stock de Hemina, 500ml - agua destilada UV/UF, 25ml -sangre de carnero desfibrinada y 5ml - las especies que lo

requirieran con vitamina K) fueron incubadas de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% - N₂, 10% CO₂ y 10% H. Las cepa que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *P. gingivalis* y *P. intermedia* agar y caldo (ICC) enriquecidos con Vitamina K y; *C. gingivalis*: agar y caldo ICC enriquecidos en la superficie con 0.5ml de formato (60mg/ml) - fumarato (60mg/ml).

6.7.2.2 Procedimiento para las condiciones de cultivo

Las cepas se descongelaron de manera estéril en el cuarto de microbiología. Con un mechero, un asa bacteriológica esterilizada en el fuego previamente, se realizó el sembrado en estría triple, se etiquetaron las cajas y se agruparon con cinta adherente para después llevarse a la cámara de anaerobiosis. Posterior al cultivo se verificaron purezas de morfología de colonia con ayuda del estereomicroscopio y posteriormente con microscopio óptico la morfología bacteriana de acuerdo con la cepa correspondiente, seguido de un proceso de transferencia este proceso se realizó por duplicado para garantizar la viabilidad y descartar la contaminación del cultivo.

El crecimiento después de 3 a 7 días del cultivo fue recolectado y colocado en tubos para micro centrifugación de 15mL que contenían 10mL de medio de cultivo DMSO enriquecido con Glucosa. Las células fueron resuspendidas para lograr OD1 a longitud de onda de 600nm 1 (OD1=10⁹ células), para ser almacenadas a -78°C hasta su uso.

6.7.3 Prueba de toxicidad para Tween 20

Prueba realizada para observar el efecto que provoca el disolvente Tween 20 a la concentración de 0.01% frente a la cepa *S. sanguinis*, evaluando de esta forma que el efecto que provoque sobre la cepa sea por los extractos y no por el disolvente.

6.7.3.1 Principio para las prueba de toxicidad

Se realizaron diluciones seriadas con tween al 0.01%, obteniendo en total 10 diluciones de 30-0.05mg/mL, la cepa *S. sanguinis* (ATCC: 10556) se ajusto con 10⁸ células bacterianas, determinadas por OD1 a 600nm.

6.7.3.2 Procedimiento para las prueba de toxicidad

Se colocaron 100µl de cada una de las diluciones 30-0.05mg/mL, obtenidas de la dilución seriada de Tween 20 y 100µl de bacteria en cada uno de los pozos, la prueba se realizó por triplicado, para el control positivo (+) se pipetearon 100µl de bacteria y 100µl de caldo, para el control negativo (-) 100µl de bacteria y 100µl de amoxicilina concentración 1mg/mL y como controles alternos 200 µl de caldo y 200 µl de Tween 20 como se muestra en la (figura 6) posteriormente se incubaron en cámara de anaerobiosis durante 36h, se colocaron a 160 rpm en una plataforma de agitación, selladas con Parafilm y cubiertas con plástico adherente, al concluir el tiempo de incubación, se retiraron las placas de 96 pozos de la cámara de anaerobiosis y se midieron con ayuda del espectrofotómetro, se utilizaron 90µl de TE y 10µl de cada pozo para realizar diluciones 1:10 que posteriormente fueron ajustadas para el análisis de los datos. Los resultados se capturaron en una base de datos de Excel 2018.

Figura 6. Representación de las prueba de toxicidad con Tween 20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	30mg/mL	15mg/mL	7.5mg/mL	3.75mg/mL	1.87mg/mL	0.93mg/mL	0.46mg/mL	0.23mg/mL	0.11mg/mL	0.05mg/mL	(+)	(-)
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●											
C	●											
D	Tween 20 0.01%										Tween	Caldo
E											●	●
F												
G												

La prueba de toxicidad con tween 20 (0.01%) se realizó en 10 concentraciones de 30-0.05mg/mL, los círculos azules representan cada dilución de tween con 100µl más 100µl de bacteria (*S. sanguinis* 10⁸), el control positivo (+) con 100µl caldo ICC y 100µl de bacteria (*S. sanguinis* 10⁸), el control negativo (-) con 100µ de amoxicilina y 100µl de bacteria y como controles negativos alternos 200µl Tween y 200µl caldo respectivamente.

El procedimiento de cultivo bacteriano para determinar unidades formadoras de colonias (UFC's), incluyó el sembrado del contenido de cada pozo, perteneciente a cada dilución del extracto. Se utilizaron tubos de microcentrifugación de 1.5 µl, previamente esterilizados en un entrecruzador de rayos UV, a los cuales se les colocó 90µl de caldo Infusión Cerebro-Corazón y 10µl del contenido del crecimiento de cada pozo. El contenido fue vertido en cajas petri que contenían medio de cultivo agar enriquecido (17g

- Trypticaseína agar base, 5ml - solución stock de Hemina, 500ml - agua destilada UV/UF, 5ml - vitamina K (especies que lo requirieran), 25ml - sangre de carnero desfibrinada), se sembró en técnica de estriado cruzado (césped), con un asa bacteriológica esterilizada en fuego. Se incubaron las placas en la cámara de anaerobiosis por 7 días y posteriormente fueron observadas con un estereomicroscópio, con el cual se realizó la identificación fenotípica y el conteo de UFC's, por medio de un equipo manual de cuenta colonias.

6.7.4 Prueba piloto

El propósito de realizar una prueba piloto fue el de seleccionar qué extractos mostraban mayor efecto antimicrobiano contra la cepa bacteriana *S. mutans*, para el posterior desarrollo de pruebas de susceptibilidad de micro dilución en caldo, con el total de las cepas seleccionadas para el presente estudio.

6.7.4.1 Principio de la prueba piloto

Se realizó una prueba piloto en la cual previamente se esterilizo por microfiltración con jeringa y filtro con poro de 0.2µm cada uno de los nueve extractos, posteriormente fue seleccionada y utilizada la dilución máxima (30mg/mL) contra la cepa *S. mutans* (cepa control resistente) ajustada 10^8 células bacterianas, determinadas por OD1 600nm en espectrofotómetro.

6.7.4.2 Procedimiento de la prueba piloto.

La prueba piloto se realizó utilizando la cepa *S. mutans* (ATCC: 25175) y los nueve extractos obtenidos de *A. denticulata*: F-Hex: fruto hexano, F-AcoEt: fruto acetato, F-MeOH: fruto metanol, H-Hex: hoja hexano, H-AcoEt: hoja acetato, H-MeOH: hoja metanol y T-Hex: tallo hexano, T-AcoEt: tallo acetato y T-MeOH: tallo metanol.

Se colocaron 100µl de cada uno de los extractos F-Hex, F-AcoEt, F-MeOH, H-Hex, H-AcoEt, H-MeOH, T-Hex, T-AcoEt y T-MeOH y 100 µl de bacteria en cada uno de los pozos. Los ensayos se realizaron por triplicado, para el control positivo (+) se pipetearon 100µl de bacteria y 100µl de caldo, para el control negativo (-) 100µl de bacteria y 100µl de amoxicilina concentración 1mg/mL y como controles alternos negativos 200 µl de

caldo y 200 µl de Tween 20 (0.01%) como se muestra en la (figura 7). Posteriormente se incubaron en la cámara de anaerobiosis durante 36h, se colocaron a 160 rpm en una plataforma de agitación selladas con Parafilm y cubiertas con plástico adherente, al concluir el tiempo de incubación, se retiraron las placas de 96 pozos de la cámara de anaerobiosis y se midieron con ayuda del espectrofotómetro, se utilizaron 90µl de TE y 10µl de cada pozo para realizar diluciones 1:10 que posteriormente fueron ajustadas para el análisis de los datos. Los resultados se capturaron en una base de datos de Excel 2018.

El procedimiento de cultivo bacteriano para determinar unidades formadoras de colonias (UFC's), incluyó el sembrado del contenido de cada pozo, perteneciente a cada dilución del extracto. Se utilizaron tubos de microcentrifugación de 1.5 µl, previamente esterilizados en un entrecruzador de rayos UV, a los cuales se les colocó 90µl de caldo Infusión Cerebro-Corazón y 10µl del contenido del crecimiento de cada pozo. El contenido fue vertido en cajas petri que contenían medio de cultivo agar enriquecido (17g - Trypticaseína agar base, 5ml - solución stock de Hemina, 500ml - agua destilada UV/UF, 5ml - vitamina K (especies que lo requirieran), 25ml - sangre de carnero desfibrinada), se sembró en técnica de estriado cruzado (césped), con un asa bacteriológica esterilizada en fuego. Se incubaron las placas en la cámara de anaerobiosis por 7 días y posteriormente fueron observadas con un estereomicroscópio, con el cual se realizó la identificación fenotípica y el conteo de UFC's, por medio de un equipo manual de cuenta colonias.

Figura 7. Representación de la Prueba Piloto con *S. mutans*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		30mg/mL	(+)	(-)									
A	F-Hex	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	F-AcoEt	●											
C	F-MeOH	●											
D	H-Hex	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
E	H-AcoEt	●											
F	H-MeOH	●										Tween	Caldo
G	H-Hex	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	H-AcoEt	●											
I	H-MeOH	●											

La prueba piloto evaluó los 9 extractos de *A. denticulata*, en la concentración máxima de 30mg/mL, en rojo se representa el fruto, en verde la hoja y en café el tallo, cada pozo contenía 100µl del extracto y 100µl de bacteria (*S. mutans*10⁸), el control positivo (+) con 100µl caldo ICC y 100µl de bacteria (*S. mutans* 10⁸), el control negativo (-) con 100µ de amoxicilina y 100µl de bacteria y como controles negativos alternos 200µl Tween y 200µl caldo respectivamente.

Con los resultados de la prueba piloto, se determinó que la concentración máxima a evaluar era la adecuada. Además de que los extractos con mayor efectividad antimicrobiana fueron Hoja-Hexano y Hoja-Metanol, de los cuales se procedió a realizar las pruebas de susceptibilidad en el resto de las cepas seleccionadas para el presente estudio.

6.7.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana se realizó para observar y detectar la resistencia o susceptibilidad de las cepas frente a distintas concentraciones de los extractos de la especie *A. denticulata*. En la prueba piloto *in vitro* descrita anteriormente, determinó que los extractos H-Hex y H- MeOH presentaban mejor efectividad, con lo que se decide probar al resto de las especies, corroborado con los resultados de la TLC y pruebas fitoquímicas preliminares.

6.7.5.1 Principio de susceptibilidad

Se realizó la dilución seriada de cada uno de los extractos H-Hex y H-MeOH de *A. denticulata*, se obtuvieron un total de 10 diluciones 30, 15, 7.5, 3.75, 1.87, 0.93, 0.46, 0.23, 0.11 y 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se probaron contra las 10 cepas seleccionadas utilizando el método de micro dilución en caldo.

6.7.5.2 Procedimiento de susceptibilidad

Se colocaron 100 μl de cada una de las diluciones 30-0.05 mg/mL, obtenidas de los extractos H-Hex y H-MeOH y 100 μl de bacteria en cada uno de los pozos, los ensayos se realizaron por triplicado, para el control positivo (+) se pipetearon 100 μl de cada bacteria (10^8) y 100 μl de caldo, para el control negativo (-) 100 μl de cada bacteria (10^8) y 100 μl de amoxicilina concentración 1 mg/mL y como controles alternos negativos 200 μl de caldo y 200 μl de Tween 20 como se muestra en la (figura 8). Posteriormente se incubaron en la cámara de anaerobiosis durante 36h, se colocaron a 160 rpm en una plataforma de agitación selladas con Parafilm y cubiertas con plástico adherente, al concluir el tiempo de incubación, se retiraron las placas de 96 pozos de la cámara de anaerobiosis y se midieron con ayuda del espectrofotómetro, se utilizaron 90 μl de TE y 10 μl de cada pozo

para realizar diluciones 1:10 que posteriormente fueron ajustadas para el análisis de los datos. Los resultados se capturaron en una base de datos de Excel 2018.

El procedimiento de cultivo bacteriano para determinar unidades formadoras de colonias (UFC's), incluyó el sembrado del contenido de cada pozo, perteneciente a cada dilución del extracto. Se utilizaron tubos de microcentrifugación de 1.5 µl, previamente esterilizados en un entrecruzador de rayos UV, a los cuales se les colocó 90µl de caldo Infusión Cerebro-Corazón y 10µl del contenido del crecimiento de cada pozo. El contenido fue vertido en cajas petri que contenían medio de cultivo agar enriquecido (17g - Trypticaseína agar base, 5ml - solución stock de Hemina, 500ml - agua destilada UV/UF, 5ml - vitamina K (especies que lo requirieran), 25ml - sangre de carnero desfibrinada), se sembró en técnica de estriado cruzado (césped), con un asa bacteriológica esterilizada en fuego. Se incubaron las placas en la cámara de anaerobiosis por 7 días y posteriormente fueron observadas con un estereomicroscopio, con el cual se realizó la identificación fenotípica y el conteo de UFC's, por medio de un equipo manual de cuenta colonias..

Figura 8. Representación de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	30mg/mL	15mg/mL	7.5mg/mL	3.75mg/mL	1.87mg/mL	0.93mg/mL	0.46mg/mL	0.23mg/mL	0.11mg/mL	0.05mg/mL	(+)	(-)
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●											
C	●											
D												
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●											
G	●											

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana H-Hex: hoja hexano y H-MeOH: hoja metanol de *A. denticulata*, 100µl de cada una de las diluciones 30-0.05mg/mL y 100µl de cada bacteria (10⁸), el control positivo (+) con 100µl caldo ICC y 100µl de cada bacteria (10⁸), el control negativo (-) con 100µ de amoxicilina y 100µl de bacteria y como controles negativos alternos 200µl Tween y 200µl caldo respectivamente.

6.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la lectura de medición en espectrofotómetro de las mediciones de absorbancia a 600nm, se almacenaron en una base de datos en Excel versión window 8. Cada una de las lecturas se determinaron con diluciones 1:10 que posteriormente fueron ajustadas con la fórmula $C1V1:C2C2*(Dilución)$ convertida como: $C2=(C1*V1)/(V2)*10$. Además, se restó la densidad del extracto a cada una de las lecturas en las diluciones correspondientes.

Cada cepa se evaluó por triplicado en las 10 concentraciones de (30 a 0.05 mg/mL), dando como resultado un total de 10 mediciones por cepa, promediadas entre los triplicados. En el estudio se obtuvieron en total 300 mediciones de OD1, de las cuales 30 pertenecen a cada cepa evaluada, las cuales fueron promediadas por triplicado en cada una de las concentraciones, dando una N total de 100.

Se generó una base de exportación para el análisis de datos en SPSS versión 15, utilizando para el análisis la prueba paramétrica T de Student para muestras relacionadas, dónde se compararon las densidades ópticas a 600nm de los controles positivos bacterianos por triplicado, contra cada concentración de los extractos. Se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para eliminar posibles falsos positivos por el N de muestras evaluadas.

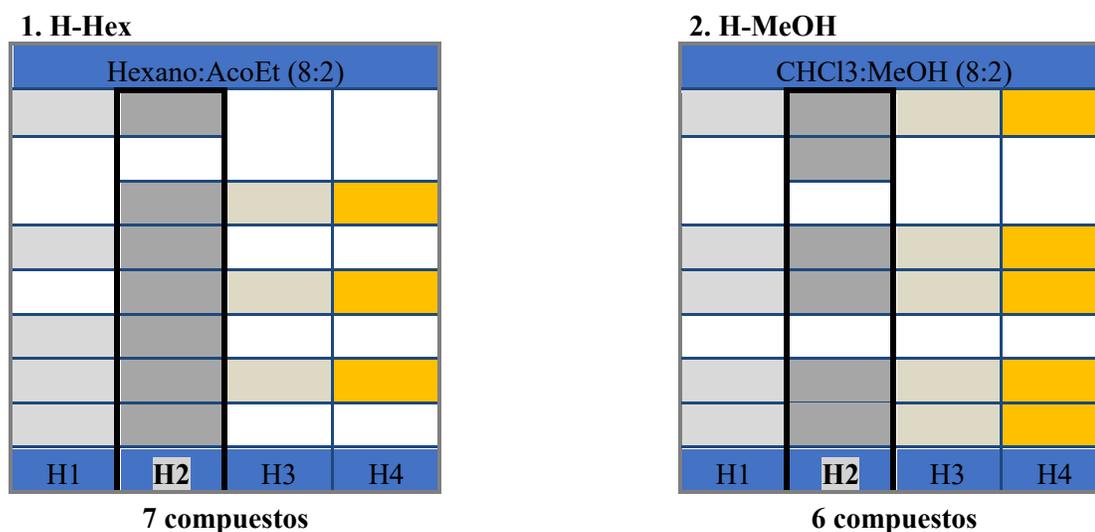
VII. RESULTADOS

7.1 Pruebas fitoquímicas

En los resultados obtenidos con la TLC realizada en las placas de silica se rastrearon 7 compuestos en el extracto 1 (Hoja-Hex) y en el extracto 2 (Hoja- MeOH) 6 compuestos que se pueden observar representados en la Figura 9.

Los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares para el extracto H-Hex determinaron la presencia de 5 grupos de metabolitos secundarios descritos en la Tabla 4 entre los que se encuentran; las saponinas esteroidales y triterpenicas, los taninos y OH fenólicos, las antraquinonas, los esteroides y triterpenos y las cumarinas. Y para el extracto H-MeOH se observó la presencia 6 metabolitos secundarios; las saponinas, los taninos y OH fenólicos, los flavonoides y los esteroides y triterpenos. Los resultados obtenidos con la evaluación fitoquímica determinaron los extractos a utilizar para la evaluación antimicrobiana *in-vitro* contra las 10 cepas bacterianas previamente seleccionadas.

Figura 9. Representación de los compuestos químicos rastreados con TLC.



En la imagen se observan los compuestos químicos rastreados con la cromatografía de capa fina TLC en placa de silica de 5x5cm, los extractos H-Hex (hoja hexano) y H-MeOH (hoja metanol) fueron sembrados por cuadruplicado y se corrió con 4 reveladores H1 (sulfato sérico), H2 (ácido sulfúrico), H3 (vainillina) y H4 (draggo ó draguendoff).

Tabla 4. Pruebas Fitoquímicas Preliminares

Grupo de metabolitos secundarios	H-Hex		H-MeOH	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Alcaloides				
Saponinas			X	
Saponinas esteroidales y triterpenoides	X			
Taninos y OH fenólicos	X		X	
antraquinonas	X			
Flavonoides			X	
Chalconas y Auronas				
Esteroides y triterpenos	X		X	
Cumarinas	X			

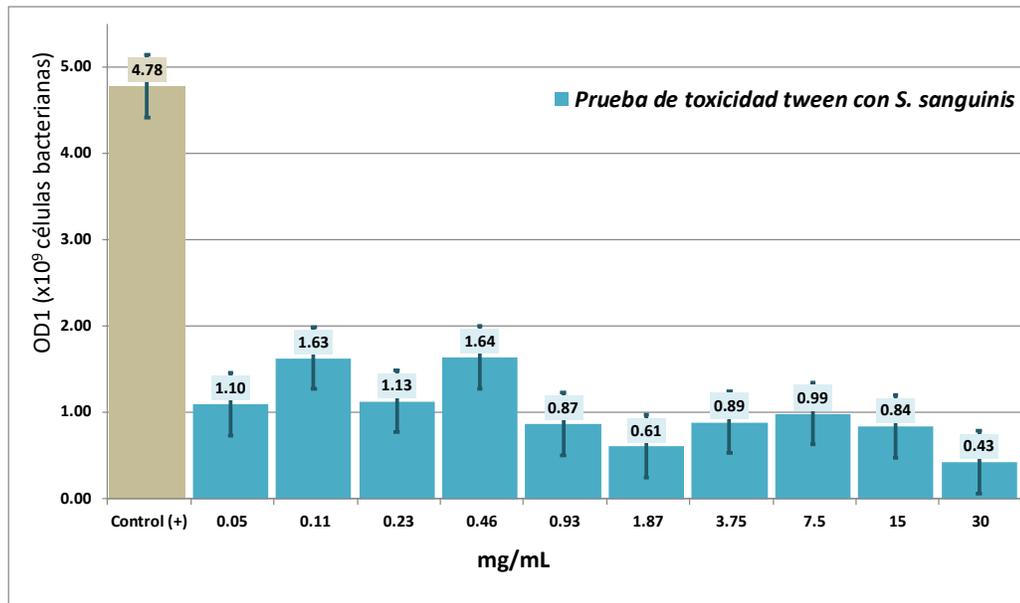
En la tabla 4 se observa la presencia de metabolitos secundarios en los extractos H-Hex y H-MeOH, el resultado es positivo (+) para saponinas, saponinas esteroidales y triterpenoides, taninos y OH fenólicos, antraquinonas, flavonoides, esteroides y triterpenos y cumarinas.

7.2 Pruebas Microbiológicas

7.2.1 Resultados de la prueba de toxicidad

Con tween 20 concentración 0.01% contra la cepa *S. sanguinis* se determinó que existe inhibición de la cepa en las concentraciones 1.87, 0.98, 0.46, 0.11 y 0.05mg/mL la última concentración, con inhibición del 45.4% resultado corroborado con el conteo de UFC's, sin embargo no se observó actividad bactericida en el UFC's por lo cual se decidió utilizar tween 20 concentración 0.01% como disolvente a las concentraciones mencionadas. En la figura 10 se representan las 10 concentraciones obtenidas con tween 20 (30-0.05mg/mL) contra la cepa *S. sanguinis*, cada una de las concentraciones se comparó con el control positivo bacteriano, determinando que reduce el crecimiento de la cepa sin embargo no se observa actividad bactericida.

Figura 10. Resultados de Prueba de toxicidad de Tween con *S. sanguinis*.

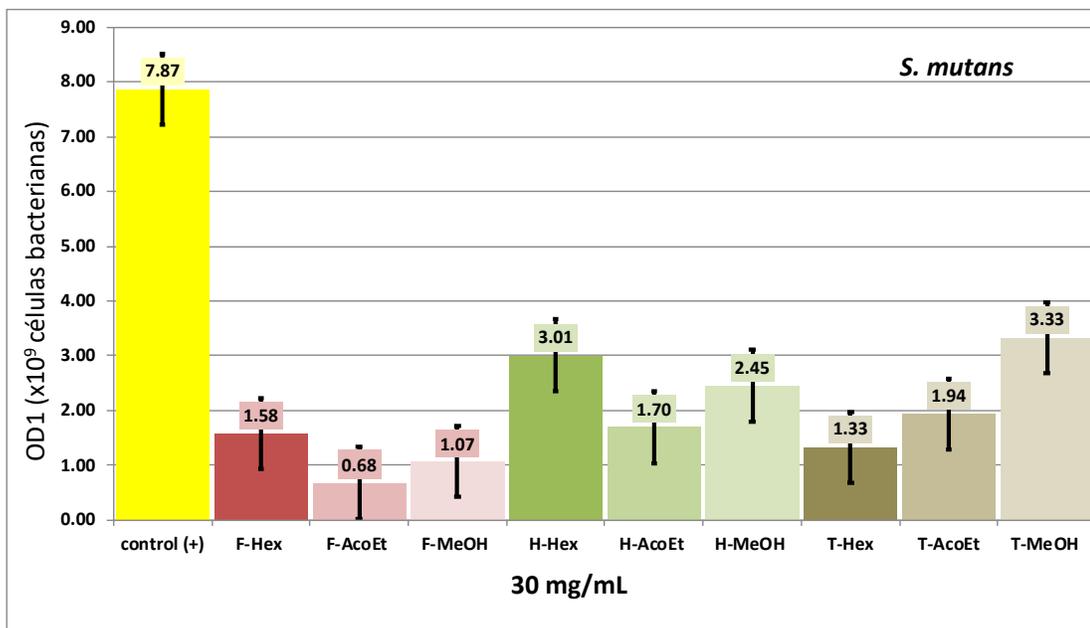


En la figura 10 tween 20 (0.01%) concentraciones de (30-0.05mg/mL) contra la cepa *S. sanguinis*, se aprecia el crecimiento de la cepa con el control positivo (+) determinando que existe crecimiento de la bacteria en todas las concentraciones.

7.3 Resultados de la Prueba piloto

Con los resultados obtenidos de la prueba piloto, en la que se evaluaron los 9 extractos de *A. denticulata* en la concentración máxima (30mg/mL) contra la cepa *S. mutans*, se determinó mayor efectividad con los extractos F-Hex, F-AcoEt, F-MeOH, H-Hex, H-AcoEt, H-MeOH y T-Hex, T-AcoEt y T-MeOH. Se decidió seleccionar dos extractos para las pruebas posteriores, respaldando esta decisión con lo observado en la TLC en la cual se aprecia mayor cantidad de compuestos químicos esto en comparación con el resto de los extractos. Y los resultados positivos obtenidos durante las pruebas fitoquímicas preliminares para distintos metabolitos secundarios descritos en la tabla 4.

Figura 11. Prueba piloto extractos de *A. denticulata* contra *S. mutans*



En la figura 11 se representan en barras de color rojo los extractos de *A. denticulata*: F-Hex fruto hexano, F-AcoEt fruto acetato de etilo, F-MeOH fruto metanol, en barras de color verde H-Hex Hoja hexano, H-AcoEt hoja acetato de etilo, H-MeOH hoja metanol y en barras de color café T-Hex Tallo hexano, T-AcoEt Tallo acetato de etilo, T-MeOH Tallo metanol concentración 30mg/mL contra la cepa (*S. mutans* 10⁸) se compara contra el crecimiento de la cepa con el control positivo (+) determinando que existe crecimiento de la bacteria en todas los extractos.

7.4 Resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Con los resultados observados durante las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron identificadas las bacterias más susceptibles a los extractos H-Hex y H-MeOH, Se determinó como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para ambos extractos (15mg/mL) y se realizaron comparaciones pareadas con la prueba T de Student de los controles positivos bacterianos (media por triplicado) contra cada una de las concentraciones de los extractos de 30 a 0.05mg/mL (media por triplicado). En la tabla 5 se describen las significancias obtenidas a partir de las comparaciones con la prueba T de Student y el ajuste de comparaciones múltiples representado en color rojo *** $p < 0.001$, color naranja ** $p < 0.01$ y color verde * $p < 0.05$

Las cepas que no muestran significancia estadística a partir de 15mg/mL en el extracto H-Hex son: (1) para *S. mutans*, (2) *S. sanguinis*, sin embargo en los resultados del extracto H-MeOH en la columna con el código (1) se aprecia a *S. mutans* con $***p<0.001$ en las concentraciones de 0.46-0.05mg/mL y $*p<0.05$ en la concentración 7.5mg/mL, en la columna con el código (2) se aprecia a *S. sanguinis* con una $*p<0.05$ en la concentración 0.46mg/mL, en la columna con el código (3) asignado a la cepa *A. viscosus* se aprecia una $***p<0.001$ en la concentración de 3.75mg/mL y $*p<0.05$ en la columna (4) asignada para *V. parvula* se aprecia una $*p<0.05$ en la concentración menor de 0.05mg/mL

Tabla 5. Resultados de la Prueba T de Student para muestras relacionadas.

H-Hex/cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Control - 0.05 mg/mL	0.05	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
Control - 0.11 mg/mL	0.47	0.03	0.52	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
Control - 0.23 mg/mL	0.03	0.01	0.25	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02
Control - 0.46 mg/mL	0.05	0.26	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
Control - 0.93 mg/mL	0.09	0.83	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02
Control - 1.87 mg/mL	0.02	0.02	0.00	0.04	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Control - 3.75 mg/mL	0.01	0.01	0.00	0.34	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01
Control - 7.5 mg/mL	0.02	0.56	0.00	0.24	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Control - 15 mg/mL	0.09	0.49	0.00	0.14	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Control - 30 mg/mL	0.06	0.40	0.00	0.01	0.00	0.01	0.03	0.00	0.01	0.02
H-MeOH/cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Control - 0.05 mg/mL	0.00	0.18	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Control - 0.11 mg/mL	0.00	0.18	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Control - 0.23 mg/mL	0.00	0.16	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Control - 0.46 mg/mL	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00
Control - 0.93 mg/mL	0.07	0.18	0.05	0.03	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01
Control - 1.87 mg/mL	0.09	0.32	0.04	0.12	0.00	0.07	0.01	0.01	0.03	0.06
Control - 3.75 mg/mL	0.01	0.45	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Control - 7.5 mg/mL	0.00	0.27	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Control - 15 mg/mL	0.01	0.08	0.04	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Control - 30 mg/mL	0.04	0.46	0.12	0.11	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.02

Ajuste general (10)

*0.05	0.00507
**0.01	0.00100
***0.001	0.00010

En la tabla 5 se observan las significancias obtenidas con la prueba T de Student, el código de los extractos es H-Hex (hoja hexano) y H-MeOH (hoja metanol) y para las cepas los números: (1) para *S. mutans*, (2) *S. sanguinis*, (3) *A. viscosus*, (4) *V. parvula*, (5) *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, (6) *P. micra*, (7) *A. actinomycetemcomitans* stp. b, (8) *C. gingivalis*, (9) *P. intermedia* y (10) *P. gingivalis*. Con ajuste de comparaciones múltiples, el color rojo representa una $***p<0.001$, naranja $**p<0.01$ y verde $*p<0.05$.

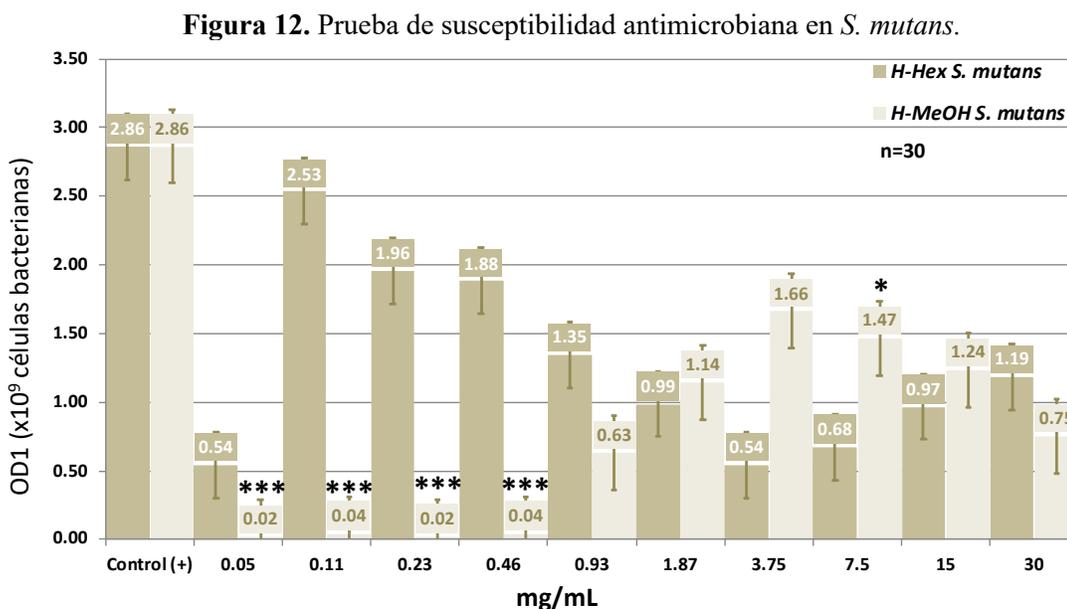
Los resultados del UFC's son descritos en la tabla 6, corroboran los resultados obtenidos en la prueba estadística T de Student para obtener estos resultados se cultivó y sembró una muestra de cada una de las diluciones evaluadas con las distintas cepas se dejó incubar durante 7 días y concluido el tiempo se realizó el conteo, en la tabla 6 se aprecian las cepas en las que no se observó actividad bactericida en a partir de la CMI 15mg/mL con el extracto H-Hex fueron: *S. mutans*, *A. viscosus* y *A. actinomycetemcomitans* stp. b, mientras que para el extracto H-MeOH fue únicamente: *V. parvula*.

Tabla 6. Conteo de unidades Formadoras de Colonia UFC's

Cepa-H-Hex mg/mL	30	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	0.23	0.11	0.05
<i>S. mutans</i>	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
<i>S. sanguinis</i>	0	++	+	0	0	0	60	10	++	+++
<i>A. viscosus</i>	1480	++	2210	2180	2080	2580	2690	2530	120	2310
<i>V. parvula</i>	0	0	0	++	++	++	++	++	++	+++
<i>F. nucleatum subsp nuc.</i>	170	0	0	0	0	30	560	240	720	++
<i>P. micra</i>	0	0	0	40	17	++	++	++	++	++
<i>A. a. stp. b</i>	20	1010	++	+++	++	++	++	++	++	++
<i>C. gingivalis</i>	0	0	830	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>P. intermedia</i>	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++
<i>P. gingivalis</i>	0	0	++	++	++	++	++	++	++	++
Cepa- H-MeOH mg/mL	30	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	0.23	0.11	0.05
<i>S. mutans</i>	++	+++	+++	+++	++	++	0	0	10	0
<i>S. sanguinis</i>	++	+++	+++	+++	++	++	0	0	++	0
<i>A. viscosus</i>	0	0	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>V. parvula</i>	+++	2540	++	++	++	1490	1220	950	1620	750
<i>F. nuc. subsp nuc</i>	0	130	0	10	0	++	++	++	+	++
<i>P. micra</i>	0	0	10	0	0	60	0	0	++	++
<i>A. a. stp b</i>	0	650	++	++	++	1890	++	++	++	++
<i>C. gingivalis</i>	0	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>P. intermedia</i>	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++
<i>P. gingivalis</i>	0	0	++	++	++	++	++	++	++	++

tabla 6. Describe el crecimiento de Unidades Formadoras de colonias (UFC's), en las 10 cepas evaluadas, los dos extractos H-Hex y H-MeOH en las diez concentraciones de (0.05 a 30mg/mL) el crecimiento negativo (-) se muestra en 0, el crecimiento bajo se muestra en (+), el crecimiento medio (++) y el crecimiento alto (+++).

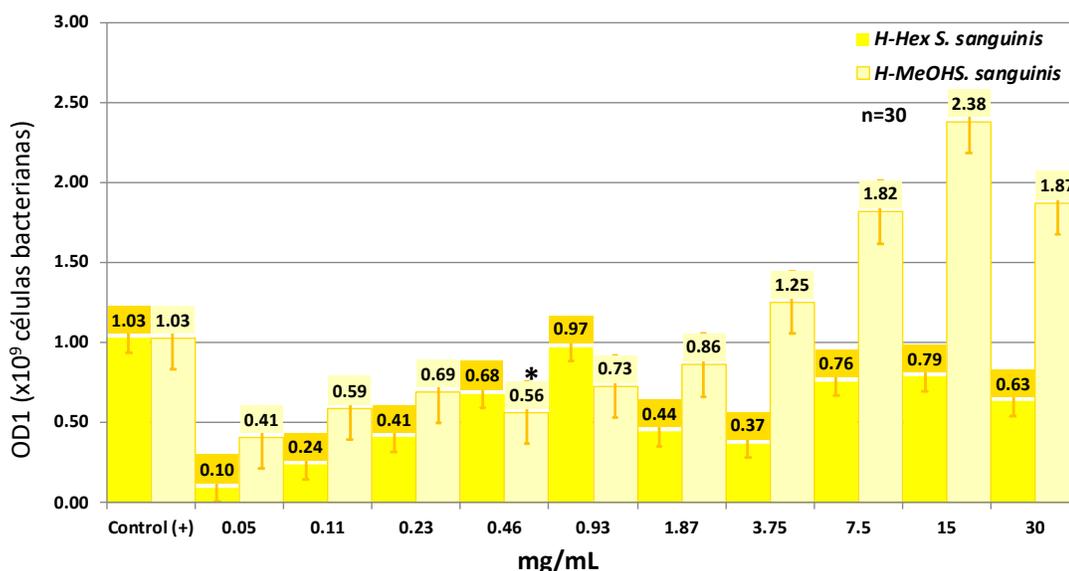
En la figura 12 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color café oscuro y H- MeOH en barras de color café claro contra la cepa *S. mutans* para determinar la inhibición bacteriana de las 10 concentraciones de ambos extractos que van de 0.05 a 30mg/mL comparadas contra el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos, con el extracto H- Hex se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración 30 sin embargo en la prueba estadística no se observan significancias en dicha cepa *S. mutans*, UFC's en el conteo de unidades formadoras de colonia no se observa actividad bactericida, pero se puede apreciar actividad bacteriostática en el total de las concentraciones resultado descrito en la (tabla 6). Sin embargo con el extracto H-MeOH se puede apreciar susceptibilidad en la cepa *S. mutans* en las 10 concentraciones, al realizar la prueba estadística T-student y el ajuste de comparaciones multiples descrita en la (tabla 5) se observó significancia de $***p < 0.001$ en las concentraciones 0.46, 0.23, 0.11 y 0.05mg/mL y $*p < 0.05$ en 7.5mg/mL, los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo en las concentraciones de 0.46, 0.23 y 0.05mg/mL resultado descrito en la (tabla 6).



El extracto H-MeOH mostro significancia de $***p < 0.001$ concentraciones 0.46, 0.23, 0.11 y 0.05mg/mL contra *S. mutans* (tabla 5), resultados corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo (tabla 6).

En la figura 13 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color amarillo oscuro y H- MeOH en barras de color amarillo claro contra la cepa *S. sanguinis*, para determinar la inhibición bacteriana de las 10 concentraciones de ambos extractos que van de 0.05 a 30mg/mL comparadas contra el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos sin embargo con el extracto H-Hex se puede apreciar susceptibilidad en la cepa *S. sanguinis* en las 10 concentraciones, al realizar la prueba estadística T-student y el ajuste de comparaciones multiples descrita en la (tabla 5), no se aprecian significancias estadísticas, los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo en las concentraciones de 30, 3.75, 1.87 y 0.93mg/mL resultado descrito en la (tabla 6). Con el extracto H-MeOH no se aprecia en la gráfica inhibición en el total de las concentraciones, con la prueba estadística T-Student, no se observan significancias en dicha cepa *S. sanguinis*, y en el UFC's no se observa actividad bactericida en las concentraciones 0.46, 0.23 y 0.05mg/mL y actividad bacteriostática a partir de la concentración máxima de 30mg/mL.

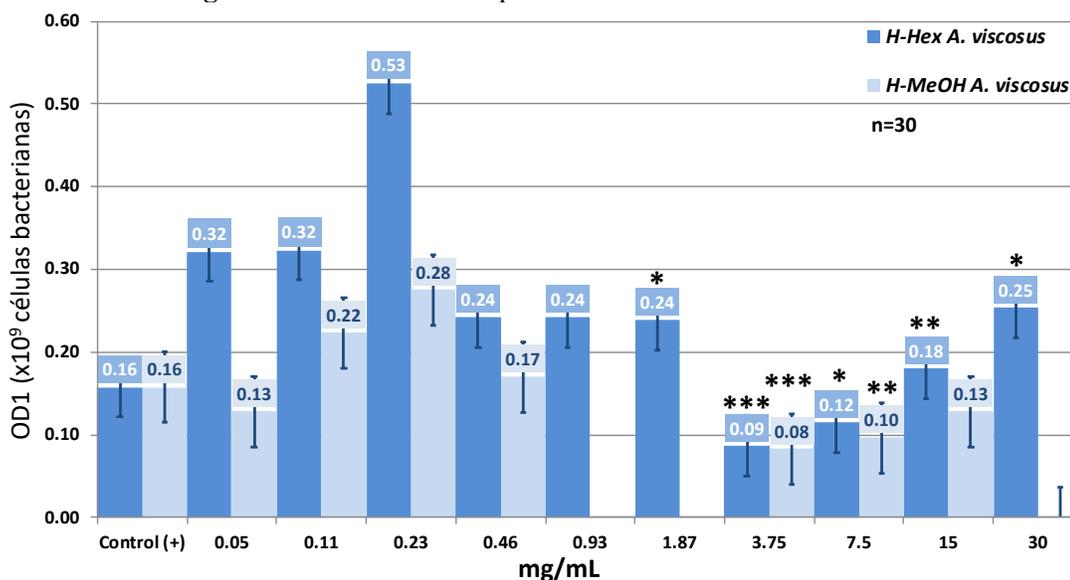
Figura 13. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *S. sanguinis*.



La cepa *S. sanguinis* mostró significancia de $*p < 0.05$ con el extracto H-Hex se observó en la concentración: 7.5mg/mL. (tabla 5) Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo (tabla 6).

En la figura 14 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color azul oscuro y H- MeOH en barras de color azul claro contra la cepa *A. viscosus* para determinar la inhibición bacteriana de las 10 concentraciones de ambos extractos que van de 0.05 a 30mg/mL comparadas contra el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para el extracto H-Hex, se puede apreciar susceptibilidad en la cepa *A. viscosus* en las 10 concentraciones, al realizar la prueba estadística T-student y el ajuste de comparaciones múltiples descrita en la (tabla 5) se observó significancia de $***p < 0.001$ en la concentración 3.75mg/mL y $***p < 0.05$ en 7.5mg/mL, los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se no muestra control de crecimiento negativo sin embargo se observa actividad bactericida resultado descrito en la (tabla 6). Con el extracto H- MeOH se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración máxima de 30mg/mL sin embargo en la prueba estadística se observan significancias $***p < 0.001$ en la concentración 3.75mg/mL, en el UFC's contero de unidades formadoras de colonia se observa actividad bactericida en las concentraciones de 30 y 15mg/mL y se aprecia actividad bacteriostática en el resto de las concentraciones resultado descrito en la (tabla 6).

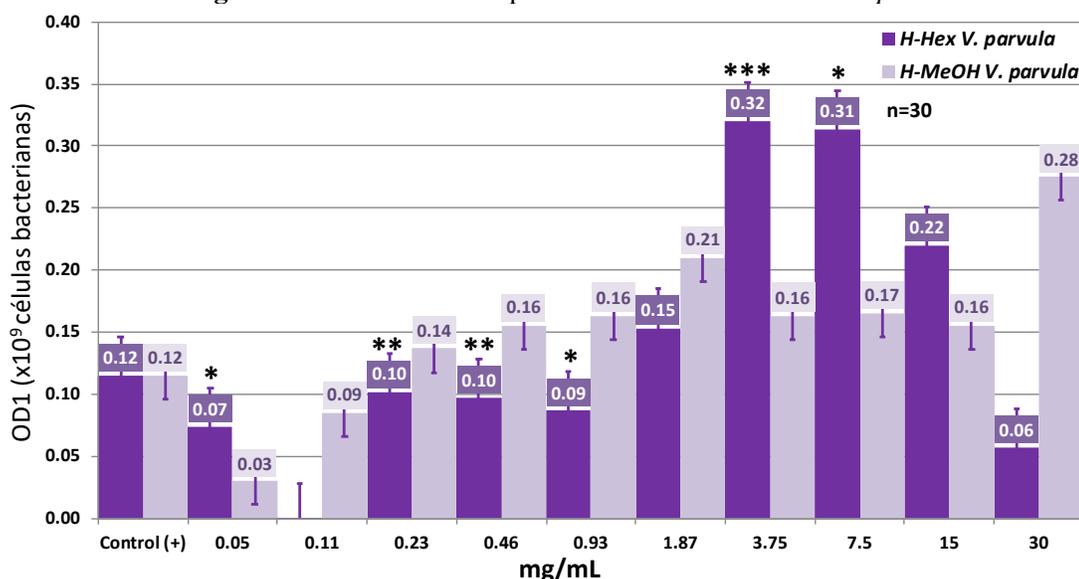
Figura 14. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *A. viscosus*.



La cepa *A. viscosus* mostro significancia de $***p < 0.001$ con el extracto H-Hex en la concentración: 3.75mg/mL y el extracto H-MeOH en: 3.75mg/mL. (tabla 5) Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo (tabla 6).

En la figura 15 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color morado oscuro y H- MeOH en barras de color morado claro contra la cepa *V. parvula* para determinar la inhibición bacteriana de las 10 concentraciones de ambos extractos que van de 0.05 a 30mg/mL comparadas contra el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos sin embargo con el extracto H-Hex se puede apreciar susceptibilidad en la cepa *V. parvula*, al realizar la prueba estadística T-student y el ajuste de comparaciones múltiples descrito en la (tabla 5) se observó $**p < 0.01$ en las concentraciones 0.46 y 0.23mg/mL y $*p < 0.05$ en 0.05mg/mL, los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo en las concentraciones de 30, 15 y 7.5mg/mL resultado descrito en la (tabla 6). Con el extracto H- MeOH se aprecia inhibición a partir de la concentración 30 sin embargo en la prueba estadística se observan significancias de $*p < 0.05$ en 0.05mg/mL y en el UFC's contero de unidades formadoras de colonia no se observa actividad bactericida, pero si se puede apreciar actividad bacteriostática en el total de las concentraciones resultado descrito en la tabla 6.

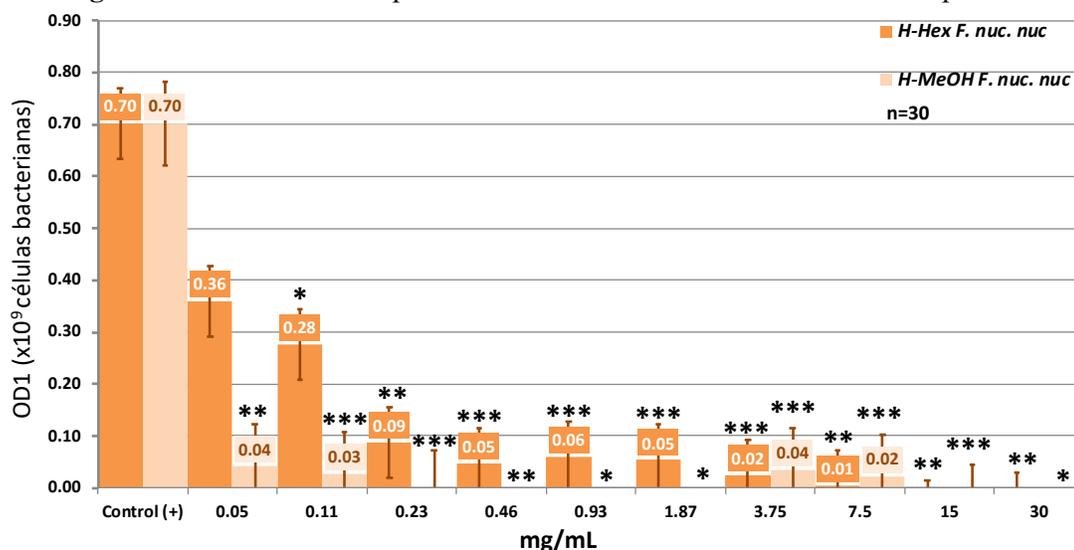
Figura 15. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *V. parvula*.



La cepa *V. parvula* mostró diferencias significativas de $**p < 0.01$ con el extracto H-Hex en las concentraciones: 0.46 y 0.23mg/mL. (tabla 5) Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo (tabla 6).

La figura 16 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color naranja oscuro y H- MeOH en barras de color naranja claro contra la cepa *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* para determinar la inhibición bacteriana en las concentraciones de 0.05 a 30mg/mL comparadas con el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determinó como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos sin embargo con el extracto H-Hex se aprecia susceptibilidad en la cepa *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* en las 10 concentraciones, con la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones múltiples (tabla 5) se observó significancia de $***p<0.001$ en las concentraciones 15, 3.75, 1.87, 0.93, 0.46 mg/mL, $**p< 0.01$ en 30, 15, 7.5 y 0.23 mg/mL, $*p< 0.05$ en la concentración de 0.11mg/mL. Los resultados se corroboraron con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias apreciando control de crecimiento negativo en las concentraciones 15, 7.5, 3.75 y 1.87mg/mL resultado descrito en la (tabla 6). Con el extracto H- MeOH se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración máxima y en la prueba estadística se observan significancias $***p<0.001$ en las concentraciones 15, 7.5, 3.75, 0.23 y 0.11mg/mL, $**p<0.01$ en 0.46 y 0.05mg/mL, $*p<0.05$ en 1.87 y 0.93mg/mL, en el UFC's conteo de unidades formadoras de colonia se observa actividad bactericida en las concentraciones de 30, 7.5 y 1.87 mg/mL y actividad bacteriostática en el resto de las concentraciones (tabla 6).

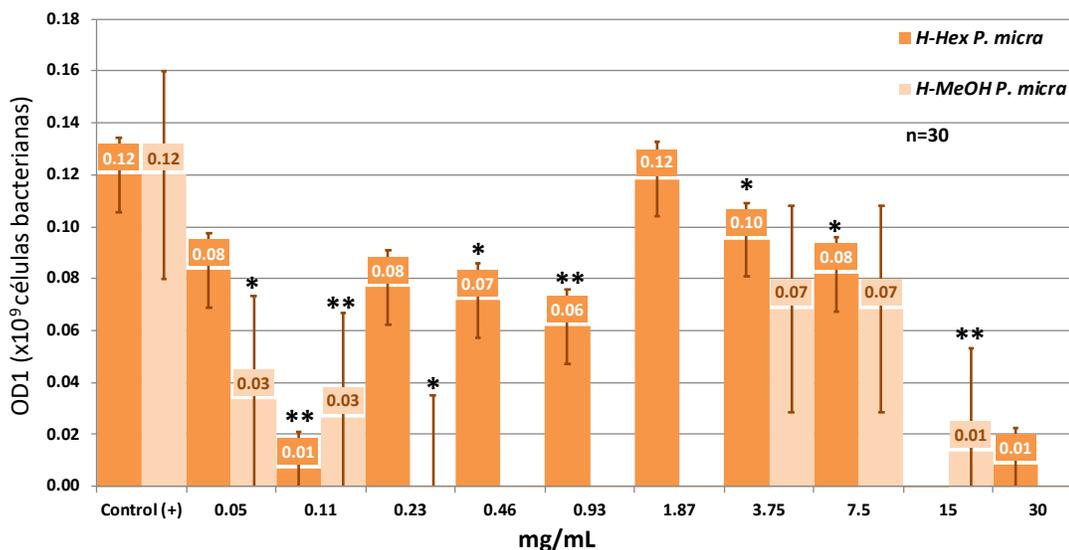
Figura 16. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*.



La cepa *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, se observan diferencias estadísticamente significativas con la prueba T-Student $***p<0.001$ (tabla 5) susceptibilidad corroborada con crecimientos negativos en el UFC's (tabla 6).

En la figura 17 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color naranja oscuro y H- MeOH en barras de naranja café claro contra la cepa *P. micra*. para determinar la inhibición bacteriana de las 10 concentraciones de ambos extractos que van de 0.05 a 30mg/mL comparadas contra el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos sin embargo con el extracto H-Hex se puede apreciar susceptibilidad en la cepa *P. micra*. en las 10 concentraciones, al realizar la prueba estadística T-student y el ajuste de comparaciones multiples descrita en la (tabla 5) se observó significancia de $**p<0.01$ en la concentraciones 0.11 mg/mL, los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo en las concentraciones de 30, 15 y 7.5mg/mL resultado descrito en la (tabla 6). Con el extracto H- MeOH se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración 30 sin embargo en la prueba estadística se observaron significancias $**p<0.01$ en las concentraciones 15, 0.23 y 0.11mg/mL, en el UFC's conteo de unidades formadoras de colonia se observa actividad bactericida en las concentraciones 30, 15, 3.75, 1.87, 0.46 y 0.23mg/mL, se puede apreciar actividad bacteriostática en el total de las concentraciones resultado descrito en la (tabla 6).

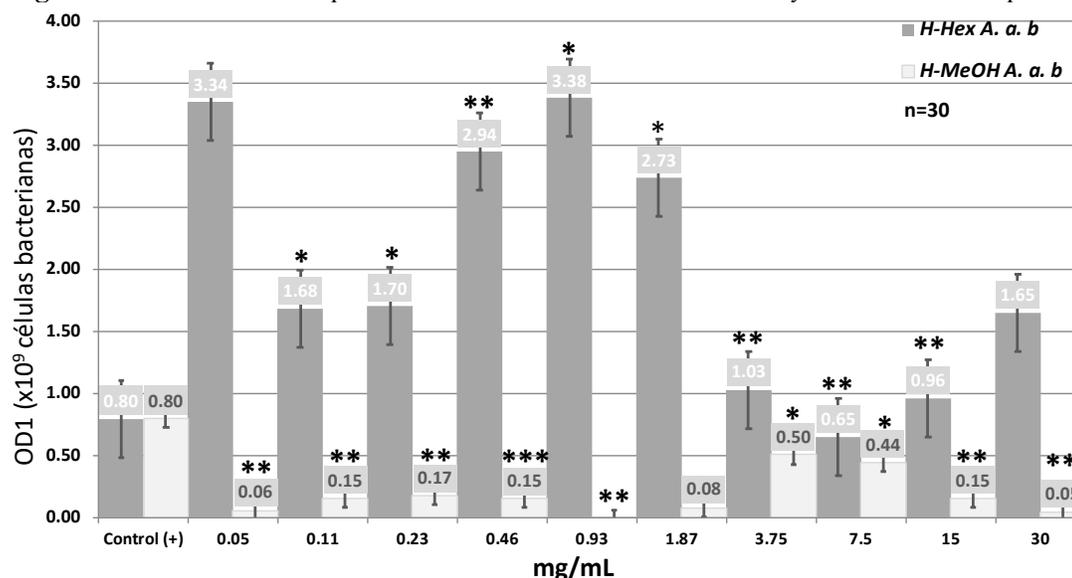
Figura 17. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de en *P. micra*.



La cepa *P. micra* mostro significancia de $**p<0.001$ con el extracto H-Hex en la concentración: 0.11mg/mL y con el extracto H-MeOH en: 15, 0.93 y 0.11mg/mL. (tabla 5) Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo. (tabla 6)

En la figura 18 se describe la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color café oscuro y H- MeOH en barras de color café claro contra la cepa *A. actinomycetemcomitans* stp. b para determinar la inhibición bacteriana de las concentraciones de 0.05 a 30mg/mL comparadas con el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos, con el extracto H- Hex se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración 30 sin embargo en la prueba estadística t -Student se observan significancias: $**p < 0.01$ en las concentraciones 15, 7.5, 3.75, 0.46, 0.23, 0.11 y 0.05mg/mL y $*p < 0.05$ en 1.87, 0.93, 0.23, 0.11mg/mL, el UFC's conteo de unidades formadoras de colonia es negativo para actividad bactericida y positivo para actividad bacteriostática en el total de las concentraciones (tabla 6). Sin embargo, con el extracto H- MeOH se aprecia susceptibilidad en la cepa *A. actinomycetemcomitans* stp. b en las 10 concentraciones, con la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones múltiples (tabla 5) se observó significancia de $***p < 0.001$ en la concentración 0.46 mg/mL y $**p < 0.01$ en 30, 15, 0.93, 0.23, 0.11 y 0.05mg/mL, en el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias se aprecia crecimiento negativo en la concentración de 30mg/mL y actividad bacteriostática en el resto de las concentraciones (tabla 6).

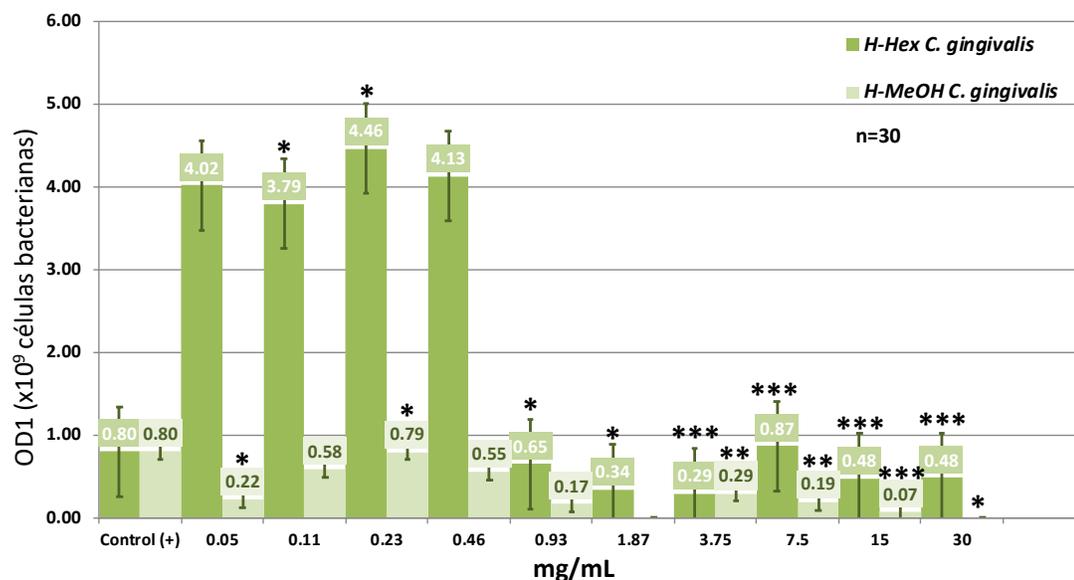
Figura 18. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *A. actinomycetemcomitans* stp. b.



La cepa *A. actinomycetemcomitans* stp. b. mostró significancia de $*p < 0.001$ con el extracto H- MeOH en la concentración: 0.46mg/mL (tabla 5). Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's en los cuales se observa crecimiento negativo (tabla 6).

En la figura 19 se describen los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H-Hex en barras de color verde oscuro y H-MeOH en barras de color verde claro contra la cepa *C. gingivalis* para determinar la inhibición bacteriana de las concentraciones de ambos extractos de 0.05-30mg/mL comparadas con el control de crecimiento positivo bacteriano. La concentración mínima inhibitoria determinada es 15mg/mL para ambos extractos, con el extracto H- Hex se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración máxima 30mg/mL al realizar la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones multiples (tabla 5) se observó significancia de $***p < 0.001$ en las concentraciones 30, 15 y 3.75mg/mL y $*p < 0.05$ en 0.46, 0.23 y 0.11mg/mL, en el UFC's conteo de unidades formadoras de colonia se aprecia actividad bactericida en la concentraciones 30 y 15mg/mL y para el resto de las concentraciones actividad bacteriostática resultado (tabla 6). Sin embargo con el extracto H-MeOH se aprecia susceptibilidad en la cepa *C. gingivalis* en las 10 concentraciones, al realizar la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones multiples (tabla 5) se observó significancia de $***p < 0.001$ en las concentraciones 15mg/mL, $**p < 0.01$ en 7.5 y 3.75mg/mL y $*p < 0.05$ 0.23 y 0.05mg/mL, resultados corroborados con el UFC's mostrando crecimiento negativo en la concentración de 30mg/mL (tabla 6).

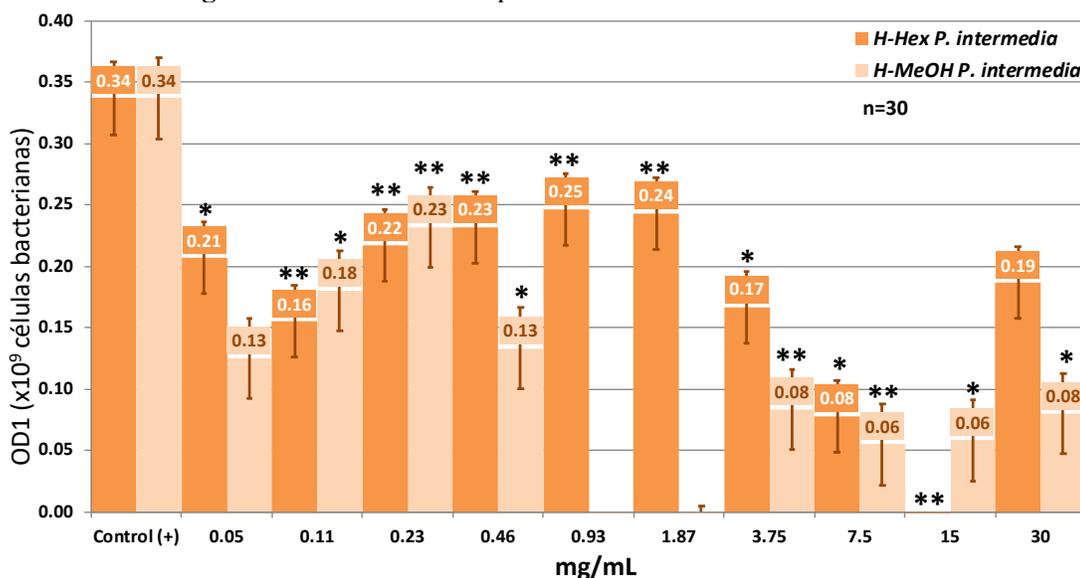
Figura 19. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *C. gingivalis*



La cepa *C. gingivalis* mostró significancia de $***p < 0.001$ con el extracto H-Hex en 4 concentraciones: 30-3.75 mg/mL y con el extracto H-MeOH en: 15mg/mL (tabla 5). Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's en los cuales se observa control de crecimiento negativo (tabla 6).

La figura 20 describe los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color naranja oscuro y H- MeOH en barras de color naranja claro contra la cepa *P. intermedia*. para determinar la inhibición bacteriana de las concentraciones de ambos extractos de 0.05 a 30mg/mL comparadas con el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determinó la concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos, con el extracto H- Hex se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración máxima de 30 mg/mL, con la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones múltiples (tabla 5) se observó significancia de $**p < 0.01$ en las concentraciones 1.87, 0.93, 0.46, 0.23 y 0.11mg/mL y $*p < 0.05$ en 3.75 y 0.05mg/mL, en la cepa *P. intermedia*, en el UFC's conteo de unidades formadoras de colonia se observó actividad bactericida en las concentraciones de 30, 15, 7.5 y 3.75mg/mL y en el resto actividad bacteriostática resultado descrito en la (tabla 6). Sin embargo, con el extracto H-MeOH se aprecia susceptibilidad en la cepa *P. intermedia*. en las 10 concentraciones, con la prueba estadística T-student y el ajuste de comparaciones multiples (tabla 5) se observó significancia de $**p < 0.01$ en las concentraciones 7.5, 3.75, 0.11mg/mL y $*p < 0.05$ en 30, 15, 0.23 y 0.05mg/mL, los resultados fueron corroborados con crecimiento negativo del UFC's concentraciones 30, 15, 7.5 y 3.75mg/mL (tabla 6).

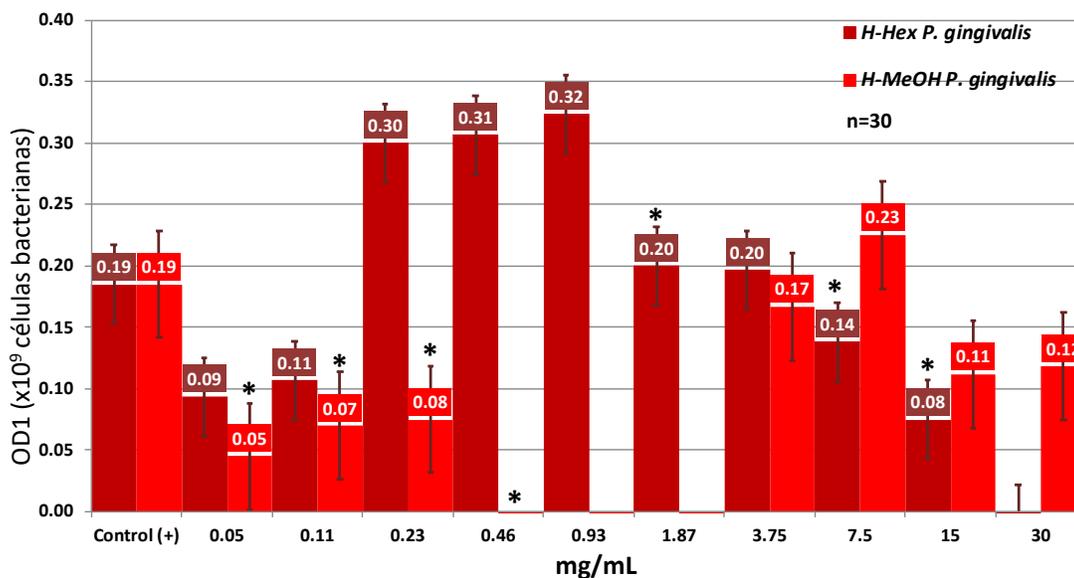
Figura 20. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *P. intermedia*.



P. intermedia mostró significancia de $**p < 0.01$ con el extracto H-Hex en 6 concentraciones: 15, 1.87-0.23 y 0.11mg/mL y con el extracto H-MeOH en 3 concentraciones: 7.5, 3.75 y 0.11mg/mL. (tabla 5) Los resultados obtenidos fueron corroborados con el UFC's en los cuales se observó crecimiento negativo. (tabla 6)

La figura 21 describe los resultados de la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos H- Hex en barras de color rojo oscuro y H- MeOH en barras de color rojo claro contra la cepa *P. gingivalis* para determinar la inhibición bacteriana de las concentraciones de ambos extractos de 0.05 a 30mg/mL comparadas con el control de crecimiento positivo bacteriano. Se determina como concentración mínima inhibitoria 15mg/mL para ambos extractos, con el extracto H- Hex se aprecia en la gráfica inhibición a partir de la concentración máxima de 30mg/mL al realizar la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones multiples descrita en la (tabla 5) se observó significancia de $*p < 0.05$ en 15, 7.5 y 1.87mg/mL, en el UFC's conteo de unidades formadoras de colonia se observó actividad bactericida en las concentraciones 30 y 15mg/mL, para el resto de las concentraciones se aprecia actividad bacteriostática en el resultado descrito en la (tabla 6). Sin embargo con el extracto H-MeOH aprecia susceptibilidad en *S. mutans* en las 10 concentraciones, con la prueba estadística T-Student y el ajuste de comparaciones multiples descrita en la (tabla 5) se observó significancia de $*p < 0.05$ en 0.23, 0.11 y 0.05mg/mL, los resultados obtenidos se corroboraron con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias observando crecimiento negativo en las concentraciones de 30 y 15mg/mL resultado descrito en la (tabla 6).

Figura 22. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en *P. gingivalis*.



La cepa *P. gingivalis* mostró significancia de $*p < 0.05$ con el extracto H-Hex en las concentraciones: 15, 7.5 y 1.87mg/mL y con el extracto H-MeOH en: 0.23, 0.11 y 0.05mg/mL (tabla 5). Los resultados fueron corroborados con el UFC's conteo de unidades formadoras de colonias en los cuales se muestra control de crecimiento negativo.

VIII. DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio fue el de evaluar la actividad antimicrobiana *in-vitro* de los extractos provenientes de la especie vegetal *A. dentiulata*, en bacterias identificadas de la placa dentobacteriana, debido a que no sólo la presencia, sino la cantidad de determinadas especies del microbioma oral humano, que forman las biopelículas dentales, se encuentran relacionadas con dos de las enfermedades bucodentales más prevalentes a nivel mundial: las enfermedades periodontales (26) y la caries dental.(61)

Para la realización de los ensayos de sensibilidad, fueron seleccionados dos de los extractos (Hoja-Hexano: H-Hex y Hoja-Metanol: H-MeOH) con mayor efectividad antimicrobiana, contra especies representativas de los complejos bacterianos de la placa subgingival (esquema de sucesión microbiana de S. Socransky y col.).(2) Entre las bacterias colonizadoras tempranas elegidas para el presente estudio, se encontraron: *A. viscosus*, *V. parvula*, *S. sanguinis* (1, 2) y la cepa *S. mutans* que fue incluida por ser una especie altamente resistente de la placa dental (oclusal), por tener propiedades de adhesión al diente y por estar estrechamente relacionada con la formación de caries dental. (61) La inclusión de especies colonizadoras puente y/o patógenas putativas *C. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* stp. b, y la cepa colonizadora tardía o patógena periodontal reconocida *P. gingivalis*, fueron seleccionadas de acuerdo con la literatura, en la cual se menciona que la presencia y el aumento en cantidad determinarían el desarrollo y susceptibilidad para presentar periodontitis (2, 41)

Para obtener la dilución de los extractos de *A. denticulata*, se decidió utilizar tween 20 al 0.01% como disolvente para los extractos del presente estudio, de acuerdo con un reporte similar (22), sin embargo, se decidió emplear una concentración menor del reporte previo en el cual se utiliza a (0.02%), con lo cual se garantiza que el efecto del disolvente sobre las estructuras bacterianas sea mínimo, como lo reporta la literatura (22). Además de ello, se realizó la prueba de toxicidad del tween 20 a distintas concentraciones, contra la cepa *S. sanguinis*. Con lo que se reporta que la inhibición del crecimiento bacteriano fue positiva en aproximadamente el 50% de la cepa, en la concentración mayor (30mg/mL) y con ningún efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa en el resto de las

concentraciones (15, 7.5, 3.75, 1.87, 0.93, 0.46, 0.23, 0.11 y 0.05, g/mL) resultado corroborado con crecimiento positivo de las UFC's de la cepa en todas las concentraciones evaluadas. Derivado de este resultado, y con la finalidad de evitar falsos positivos en la concentración máxima del solvente, se considera la CMI de los extractos a partir de la concentración (15mg /mL).

Se determinó como CMI: 15mg/mL de los extractos seleccionados: H-Hex y H- MeOH en el presente estudio, y se establece que con el extracto H-MeOH, se observa mayor actividad antimicrobiana, con efecto bactericida en el total de las cepas evaluadas. Asimismo, se observó que las cepas colonizadoras puente o patógenas putativas evaluadas en el presente estudio, son más susceptibles al efecto de los extractos de la hoja de *A. denticulata*. En reportes previos de distintos extractos vegetales de especies como: *Croton hypoleucus* (20), *Citrus reticulata* (22) y extractos enológicos (25) se evaluó la actividad antimicrobiana contra la especie *F. nucleatum*. subesp. *nucleatum*, donde los extractos de *Croton hypoleucus* mostraron actividad bactericida a concentraciones 256, 128 y 64 µg/mL, en el presente estudio, los extractos de hoja de *A. denticulata*, presentaron propiedades bactericidas en concentraciones menores (de 15 a 0.05mg/mL), resultado contradictorio al estudio previamente mencionado. Los extractos de *C. hypoleucus* mostraron propiedades antimicrobianas a la concentración 256, 128 y 64 mg/mL, sobre *F. nucleatum* (22). lo cual se considera relevante de mencionar en la presente discusión, ya que las especies vegetales evaluadas en dicho estudio crecen en arbustos, presentan tallos, hojas y frutos, similares a los de *A. denticulata*, y han sido consideradas con propiedades antimicrobianas sobre especies de la cavidad oral (22).

Derivado de que, en la literatura no existen reportes previos sobre las propiedades antimicrobianas de *A. denticulata*, se decidió describir estudios similares con especies vegetales referidos en la literatura. Los extractos de tomillo, sangre de drago, caléndula y cuachalate, son ejemplos de extractos evaluados (14), además de estudios sobre *C. hypoleucus* y *C. reticulata* (20, 25), donde reportaron la actividad antimicrobiana positiva de la cepa *A. actinomycetemcomitans* sp. b. infiriendo con ello, un equilibrio ecológico en la cavidad bucal. La reducción de dicha especie patógena putativa, favorece a la salud periodontal ya que ha sido identificada previamente, en estudios con periodontitis de tipo

"juvenil"(61), sin embargo, para poder dar un dato más preciso de equilibrio ecológico, es necesario evaluar un mayor número de especies representativas de los complejos bacterianos, como se realizó en el presente estudio. Por otro lado, los extractos de *A. denticulata* presentaron efecto antimicrobiano sobre el total de las especies evaluadas, con mejor efectividad sobre especies patógenas y patógenas putativas. Al confrontar los resultados de los estudios previamente mencionados (14, 20, 25), se puede determinar que, los extractos *A. denticulata* a las concentraciones de 30 a 3.75 mg/mL y de 0.23 a 0.05mg/mL, muestran mayor efecto antimicrobiano que en las concentraciones de estudios previos.(20, 25)

La especie patógena periodontal reconocida *P. gingivalis* mostró susceptibilidad en las concentraciones más bajas de H-Hex (0.46 a 0.05 mg/μl) en el presente estudio. En literatura referida, los extractos de tomillo, sangre de drago, caléndula, cuachalate (14) reportan la reducción de la misma cepa, sin embargo, no presentan mayores significancias.

Las cepas evaluadas en el presente estudio, que mostraron mayor resistencia a los extractos de hoja de *A. denticulata*, fueron colonizadoras tempranas como: *V. parvula*, sin embargo, dicho resultado fue similar al estudio enológico que evaluó la resistencia de la misma cepa, con el extracto *C. hypoleucus*, sin embargo, los extractos de *A. denticulata* mostraron efecto antimicrobiano en al menos una concentración en el presente estudio. La literatura refiere que el extracto de *Stevia rebaudiana*, probado sobre la cepa *A. viscosus* (24), mostró inhibición de crecimiento a partir de la concentración máxima de 30 a 50 mg/mL, mientras que el extracto de *A. denticulata* tiene el mismo efecto, en concentraciones menores desde 7.5 a 3.75 mg/mL. Los resultados obtenidos en el presente estudio, comparados con estudios previos como el de *Stevia rebaudiana* (24) y el de *C. hypoleucus* (20) sobre una de las cepas más resistentes *S. sanguinis*, lograron demostrar que existe actividad antimicrobiana en al menos una concentración, caso contrario a los estudios mencionados, con los cuales no se presentaron propiedades antimicrobianas. Finalmente se referencia un estudio *in-vitro* realizado con los extractos acuosos de cáscara, pulpa y semilla de uva *Vitis vinifera* (23) en el cual, para obtener la actividad antimicrobiana similar a la clorhexidina en la cepa *S. mutans*, se emplearon concentraciones mayores de 40, 70 y 100% siendo la de 100% la más efectiva comparada

con los extractos *A. denticulata* las concentraciones para lograr el mismo efecto son menores de (7.5 mg/mL - 0.05 mg/mL).

Con los resultados del presente estudio, se sugiere que, el efecto antimicrobiano observado con los extractos de hoja de *A. denticulata*, se pueden atribuir a los compuestos químicos encontrados en la TLC y las pruebas fitoquímicas preliminares, en las cuales se determinó la presencia de saponinas: que son metabolitos secundarios estudiados por sus propiedades biológicas, refiriendo su capacidad tensioactiva, la cual genera una alteración en la fluidez y permeabilidad de la membrana celular poniendo en riesgo la vitalidad de la célula.(50, 54). Por otro lado, los taninos: son compuestos fenólicos que tienen la capacidad de combinarse con las proteínas y los polisacáridos, pudiendo precipitarse e inhibiendo el crecimiento bacteriano. Los OH fenólicos: son compuestos químicos más simples, su mecanismo de acción consiste en inactivar las proteínas anulando su función en las bacterias.(11) Los flavonoides: que son un grupo de compuestos fenólicos, actúan en la pared celular afectando el sistema de señalización celular, el cual regula el crecimiento, proliferación y apoptosis de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.(10, 56) Y los esteroides y triterpenos, tienen un mecanismo de acción sobre la membrana celular.(50, 54)

Por lo que, el efecto antimicrobiano del extracto H-MeOH, se le atribuye a la presencia de los compuestos químicos: saponinas esteroidales y triterpenoides,(50) los taninos y OH fenólicos (51) y en el extracto H-Hex los esteroides y triterpenos, sin embargo, además la presencia de: antraquinonas: que son compuestos importantes en la industria farmacéutica (AQ glicósidos) que se utilizan en la producción de Pyralvex para el tratamiento de la gingivitis, estomatitis, úlceras bucales, inflamación de la mucosa y periodontitis, previamente referido en la terapia periodontal.(52) Y a las cumarinas, que son compuestos químicos que presentan como mecanismo de acción la interacción con el ADN, se ha referido su uso como antioxidante y antibacteriano.(52, 56)

IX. CONCLUSIONES

- La investigación realizada sobre el efecto antimicrobiano de los extractos de hoja de *A. denticulata*, es la base para futuras aplicaciones en el área de la salud, ya que es una especie vegetal de fácil acceso para comunidades con bajos recursos económicos y con propiedades antibacterianas selectivas de carácter natural.
- Los extractos de *A. denticulata* mostraron efecto bactericida a la CMI 15mg/mL de la Hoja Hex y MeOH (indistintamente) en bacterias consideradas periodontopatógenas de la PDB y muestran efecto bacteriostático en especies más resistentes de *Streptococcus* sp. a concentraciones más bajas.
- Los resultados del extracto de H-MeOH sugieren mejor comportamiento bactericida, logrando mayor inhibición en las 10 bacterias evaluadas, a partir de la concentración máxima 30mg/mL, sin embargo, dicha concentración no es considerada como CMI para evitar falsos positivos en el presente estudio.
- Las bacterias más resistentes a los extractos H-Hex y H-MeOH fueron *S. sanguinis* y *S. mutans*, ambas cepas se encuentran en la biopelícula dental, están relacionadas con propiedades de adhesión al diente y estrechamente relacionados con procesos cariosos.
- Los resultados de la cromatografía de capa fina realizada en el presente estudio, mostraron la presencia de 13 compuestos totales; en el extracto H-Hex se observaron 7 y en el extracto H-MeOH se observan 6, cada uno con características químicas particulares.
- Con las pruebas fitoquímicas preliminares, se aislaron en el extracto H-Hex: saponinas esteroidales y triterponoides, taninos y OH fenólicos, antraquinonas, esteroides y triterpenos y cumarinas. Y en el extracto H-MeOH se aislaron saponinas, taninos y OH fenólicos, flavonoides y esteroides y triterpenos, que se sugieren que sean los responsables de las propiedades antimicrobianas de los extractos de hoja de *A. denticulata*.

X. RECOMENDACIONES

- Para un estudio posterior, aislar e identificar de forma específica, los metabolitos secundarios que se observaron con la TLC y las pruebas fitoquímicas preliminares.
- Realizar una segunda evaluación microbiológica, con el objetivo de conocer el efecto antibacteriano de cada uno de los compuestos químicos que se identifiquen.
- Hacer una inclusión más amplia, para evaluar la susceptibilidad de las cepas bacterianas bajo la presencia de los compuestos aislados de los extractos de hoja de *A. denticulata*.
- Realizar estudios *in-vivo* de toxicidad celular con los extractos de *A. denticulata*, previo a evaluar la efectividad en pacientes diagnosticados con enfermedades periodontales, con la finalidad de diseñar un producto natural coadyuvante que contenga componentes del extracto.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Newman MG, Takei H, Carranza FA. Periodontología Clínica. Buenos Aires Editorial Mc Graw Hill, 2002;100-156.
2. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*. 2005;38:9-12.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Determine the interrelation between microorganisms and environment that include periodontal microorganisms *Periodontol 2000*.
4. Negroni M, Marcantoni M. Microbiología Estomatológica, Argentina, Editorial panamericana, 2009;225-295.
5. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontology* 1999; 4(1): 1-6.
6. Liébana J, Castillo AM, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9
7. Newman HN, La placa dental, México, Editorial el manual moderno, pp. 7-21.
8. García AA. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (biología), serie fisiológica vegetal*. 2009; 2:119-45.
9. Núñez Colín CA, Escobedo-López D, Guzmán-Maldonado H, Guzmán-Maldonado SH, Hernández-Martínez MA. Membrillo Cimarrón o Tlaxistle Malacomeles Denticulata Kunth, G.N Jones: un frutal alternativo, acta agrícola y pecuaria, Guanajuato, 2015;1-5.
10. Gomez AM. *Nutraceuticals Nanotechnology in the agri food industry*, Elsevier, Rumania, 2016.
11. Vázquez-Flores AA, Álvarez-Parrilla E, López-Díaz JA, Wall-Medrano, De la Rosa A. *Tecnociencia, Taninos hidrosolubles y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo*, Ciudad Juárez, 2012.
12. Lozoya-Legorreta X, *Plantas Medicinales y Poder*, México, Editorial pax México. 1994.
13. Olate MS, Soto AM. *Venezuela, 2007, Determinar los antimicrobianos locales en periodoncia*, Scielo.
14. Garcia-Rodriguez A. *Propiedades antimicrobianas de extractos de tomillo, sangre de drago, caléndula, cuachalate en cultivos de Porphyromonas gingivalis y Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Nuevo León, 2011.

15. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27(10):722-32.
16. Ximenez-Fyvie LA. Description of the subgingival microbiota of periodontally Untreated Mexican subjects: Chronic Periodontitis and periodontal Health. *J Periodontol.* 2006; 10: 460-71.
17. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard HA, Jakubovics NS, Chalmers NI and Díaz PI. Bacterial interacciones and successions during plaque development. *Periodontology 2000.* 2006; 42:47-79.
18. Piñon YR, Mejía A, Ruíz G, Aguilar MI, Nieto S, Cruz JF. 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; 141:860-865.
19. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine HD, et al. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol* 2018; 89: 173-174.
20. Vargas D. Evaluación antimicrobiana *in-vitro* de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de *Crotón hypoleucus* y metanol de *leucophyllum frutescens*, Tesis, Hidalgo, 2014.
21. Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Rev chilena infectol* 2017; 34 (2):156-174.
22. Pardo CG, Monsalve GS, Alveiro E, et al. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus reticulata* sobre *Fusobacterium nucleatum* asociada a enfermedad periodontal. *Rev. Colombiana Biotecnol.* 2017;19(2):7-14.
23. Calcedo J, Mayorga F, et al. Efecto antimicrobiano de extractos acuosas de la cáscara, pulpa y semilla de uva (*vitis vinifera*) sobre *Streptococcus mutans*, estudio *in vitro*. *Kiru* 2018;15(2): 77-80.
24. Brañez Reyes, et al. Efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*, bacterias iniciadoras en la formación de biopelícula dental. 2018; 21(1):21-25.
25. Herrera D. Actividad antimicrobiana de extractos enológicos y vino sobre los patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* incluidos en un modelo de biopelícula oral *in vitro* “Máster’s thesis”. España: Bueno J. 2017;45.

26. Organización mundial de la Salud, 2019 www.who.int 2019 mayo 01.
27. Zerón A. La nueva clasificación de enfermedades periodontales. *Revista ADM* 2018; 75(3):122-124.
28. Lindhe J, Lang P, Karring T. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Madrid España, Editorial panamericana, 2008; 328-330.
29. Somolinos J. El códice de la Cruz badiano, *Salud Pública de México, Redalyc México* 1990; 32(5): 603-617.
30. Jiménez A. *Boletín CONAMED-OPS*, México 2017; 31-34.
31. Javier E, García A, Ramírez B, et al, Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara, *Scielo México* 2011;39
32. Zarate-Escobedo J, Castañeda E Cuevas J. Carillo C. Mendoza E. Serrato M. Concentraciones e intervalos de aplicación del aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. Contra *Nacobbus aberrans*. Estado de México, *Revista Mexicana de ciencias agrícolas* 2018; 9(3) 589-600.
33. Sierra-Sarmiento MA. Barros Algarra R. Gómez Paternina D. Mejía Terán A. Rivero Suarez D. *Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. 2018. Bogotá, Colombia, UNIAGRARIA pp. 7-50
34. Cruz Martinez C. Díaz Gómez M. Sook M. use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review, Republic of Korea, *Pharmaceutical, Biology*. 2017; 55(1).
35. Sharma A. Flores-Vallejo RC, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. México, *Journal of Ethnopharmacology* 208, 2017; 264-329.
36. Waizel-Bucay J. Martín Martínez I. algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. México, *Revista ADM* 2011;LXVIII(2):73-88
37. Pérez Luzardo B. Vllarroel-Dorrego M. Factores asociados a la susceptibilidad a periodontitis agresiva - Revisión de la literatura, *Acta Odontológica Venezolana* 2017;55(2) Obtenible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2017/2/art-10/> Consultado el: 24/06/2019.
38. Haffajee AD, Roberts C, Murray L, Veiga N, Martin L, Teles RP, et al. Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. *J Clin Dent*. 2009;20(7):211-7.

39. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
40. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):377-88.
41. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(3):196-205.
42. Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2003;30(11):990-5.
43. Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol*. 1997;2(1):3-10.
44. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135-87.
45. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2006;42:180-218.
46. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(10):722-32.
47. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(9):648-57.
48. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2000;27(9):637-47.
49. Díaz Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*. 2012; 5(1): 40-45.
50. López Luengo MT. Saponósidos. *Offarm*. 2001;20(6):124-9.
51. Peñarrieta MJ. Tejada L. Mollinedo P. Vila JL. Bravo JA. Compuestos Fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*. 2014; 31(2): 68-81.
52. Borroto-Blanco J. Blanco-Jerez MA. Rivas-Paneca M. Hernández de la Torre M. Concepción-Laffite O. Trujillo-Sánchez R. Meroterpenos (Antraquinonas)

en diferentes partes de las planta de Morinda Royoc L. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2005; (36).

53. Conabio, 2009 www.conabio.gob.mx 2019 septiembre 12.
54. Ahumada A. Ortega A. Chito D. Benítez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa willd*): un subproducto con alto potencial biológico. Rev. Colomb. Quím. Farm. 2016; 45(3): 438-469.
55. Paredes Salido F, Clemente Fernández A. Polifenoles de aplicación en farmacia. Offarm. 2005;24(8):85-94.
56. Domingo D. López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioterap. 2003; 16(4):385-393.
57. Caton JG. Armitage G. Berlundh T. Chapple LLC. Jepsen S. Kornam et al. A new clasification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. Journal of Clinical Periodontology. 2018; 45(20):51-58.
58. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. 2014; 35(1):3-7.
59. Moreno Caicedo LF , Amaya Sánchez S, Cruz Olivo EA. Factores de riesgo modificables e inmodificables de la periodontitis crónica: revisión narrativa. Univ Odontol. 2018; 37(79)
60. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, et al. Subgingival microbiota in healthy well-maintained elder and periodontitis subjects. J Clin Periodontol 1998;25:346-53.
61. Arreguín Acno JA, Geónimo Ríos Cecilio, Hernández Bermúdez C, Ostia Pérez MF, Ventura Arroyo JA, et al. Caries dental y microorganismos asociados a la caries en la saliva de los alumnos de primer año de la Facultad de Odontología, UNAM. 2016; 20(2):77-81.
62. Corzo Barragán DC, Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium Kunt*, 2012;43(3):81-86.
63. Benza-Bedoya R, Pareja-Vásquez M, Diagnostico y tratamiento de la periodontitis agresiva. 2017; 19(30):29-39.
64. Lozoya-Legorreta X, Zolla C, Lo invisible es verde, México, Editorial Pax México. 1994;1:1-175.

XIV. ANEXOS

12.1 Carta de aceptación para estancia de Investigación.

Laboratorio de Genética Molecular
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México

Case GM



FE-GMLIFO-013 (1)
SECCIÓN ISO: 4.2

Fecha: 01-feb-18

Folio: GMLIFO/037

Asunto: Carta de aceptación para alumna de estancia de investigación.

Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez.

Coordinador de Maestría en Ciencias Biomédicas y Salud.
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

PRESENTE

Por medio de la presente hago de su conocimiento, que la alumna Érika Alejandra Salinas Peña, estudiante de la UAEH en la Maestría correspondiente a su coordinación, con número de cuenta: 137995, es aceptada para realizar una estancia de Investigación en el Laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI de la Facultad de Odontología UNAM, por un periodo de seis meses, del 01 de marzo al 01 de septiembre del presente año.

Dentro de las actividades que realizará la alumna incluirán:

- Capacitación para identificación fenotípica microbiana.
- Técnicas de cultivo e identificación de bacterias periodontales.
- Métodos de dilución antimicrobianos.

Sin otro particular, reciba un saludo afectuoso de mi parte.

Atentamente,

Adriana Patricia Rodríguez Hernández
LAB. GENÉTICA MOLECULAR UNAM
FAC. ODONTOLÓGICA

Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández

Profesora de Carrera y Gestora de la calidad del Laboratorio de Genética Molecular.
de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.



Recibí
[Signature]
16/feb/18

Circuito Institutos
Cd. Universitaria
México D.F. 04510
FE-GMLIFO-005

12.1 Constancias y reconocimientos obtenidos





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SECRETARÍA DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN



Otorga la presente

Constancia

A **SALINAS PEÑA ERIKA ALEJANDRA**

MTRA. MARTHA MÉNDOZA RODRÍGUEZ, DR. CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ, MTRA. MARÍA DE LOURDES MÁRQUEZ CORONA, DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FVIE, MTRA. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

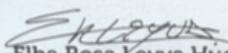
Por su participación académica con el trabajo:
**EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA IN-VITRO DE LOS EXTRACTOS AMELANCHIER DENTICULATA
FRENTA A MICROORGANISMOS ASOCIADOS CON PERIODONTITIS**

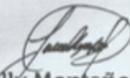
En la categoría: **CARTEL**

"Semana de la Ciencias Básicas"
**Realizada del 25 al 29 de marzo, en
la Facultad de Odontología, UNAM**

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd Mx, a 29 de marzo de 2019.


Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
Directora
Facultad de Odontología, UNAM


Lic. Lucelly Montañón Ruiz
Secretaria de Extensión y
Vinculación



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
a través del
Instituto de Ciencias de la Salud

otorga la presente

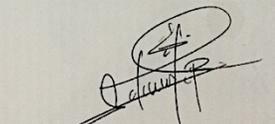
CONSTANCIA

a

**Erika Alejandra Salinas Peña, Martha Mendoza Rodríguez, Adriana Patricia Rodríguez
Hernández, María de Lourdes Márquez Corona, Laurie Ann Ximénez Fyvie**

Por su participación con el trabajo "Evaluación antimicrobiana *in vitro* de los extractos *Amelanchier denticulata* frente a microorganismos identificados en periodontitis crónica", en el VIII Foro Internacional de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud dentro del marco de la Feria Internacional de la Salud (FIS) 2018 celebrada del 14 al 22 Mayo de 2018.

Pachuca de Soto Hgo. a 21 de Mayo del 2018


M.C. Esp. Adrián Moya Escalera
Director del IC莎



Los recursos del PFCE son de carácter público y queda prohibido su uso con fines partidistas o de promoción personal

XV. GLOSARIO DE TERMINOS

<i>A. actynomicetemcomitans</i> stp. b.	<i>Aggregatibacter actynomicetemcomitans</i> stp b.
<i>A. denticulata</i>	<i>Amelanchier denticulata</i>
<i>A. viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
AcoET	acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
C ₄ H ₆ O ₃	Anhídrido acético
CHCl ₃	cloroformo
CMI	concentración mínima inhibitoria
ddH ₂ O	Agua bidestilada
DMSO	Dimetil sulfóxido
Draggo	draguendoff
F	fruto
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>
FeCl ₃	Cloruro férrico
H	hoja
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico con etanol
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	hexano
MeOH	metanol
mg	miligramos
mL	mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio
OD1	densidad óptica 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
T	tallo
TLC	Cromatografía de capa fina
UFC's	Conteo de unidades formadoras de colonia
<i>V. parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>

