



Universidad Nacional Autónoma de México



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

T E S I S

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA *in-vitro* DEL EXTRACTO DE *Jatropha dioica* FRENTE A MICROORGANISMOS DE LA BIOPELÍCULA SUBGINGIVAL.

PRESENTA

JESUS ALBERTO ESTRADA PEDRAZA

TUTORA

DRA. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Vo.Bo. 25-oct-21

ASESORAS

DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE
DRA. ALMA DELIA HERNÁNDEZ FUENTES

CIUDA DE MÉXICO

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 BIOPELÍCULAS ORALES.....	4
3.1.1 <i>Características de las biopelículas</i>	4
3.1.2 <i>Diversidad de la biopelícula subgingival relacionada con las enfermedades periodontales.....</i>	5
3.2 GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES.....	7
3.2.1 <i>Definición</i>	7
3.2.2 <i>Factores de riesgo modificables y no modificables</i>	8
3.2.3 <i>Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones peri-implantares.....</i>	8
3.3 TERAPIA PERIODONTAL ANTIMICROBIANA.....	12
3.3.1 <i>Terapias antimicrobianas contra las biopelículas orales</i>	12
3.3.2 <i>Control químico de la placa dentobacteriana.....</i>	13
3.4 FITOTERAPIA	14
3.4.1 <i>Plantas medicinales aplicadas en la cavidad bucal.....</i>	15
3.5 <i>Jatropha dioica.....</i>	16
3.5.1 <i>Taxonomía y distribución geográfica.....</i>	16
3.5.2 <i>J. dioica en la medicina tradicional.....</i>	16
3.5.3 <i>Evaluación de los componentes y propiedades de J. dioica</i>	17
3.5.4 <i>J. dioica como terapia antimicrobiana.....</i>	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 <i>General.....</i>	20
6.2 <i>Particulares</i>	20

7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Diseño experimental.....	22
7.1.1 Generalidades.....	22
7.1.2 Variables independientes.....	22
7.1.3 Variables dependientes.....	23
7.1.4 Criterios de selección.....	23
7.2 Obtención del extracto.....	24
7.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	25
7.3.1 Especies bacterianas y condiciones de cultivo.....	25
7.3.2 Dilución, esterilización y OD del extracto.....	25
7.3.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	26
7.3.4 Análisis de datos.....	27
8. RESULTADOS	29
8.1 Obtención del extracto.....	29
8.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	30
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	60
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

AGRADECIMIENTOS

A Michel quien ha sido luz en mi camino y quien abrió mi corazón al amor. Te admiro por lo que eres y el gran valor que tienes como persona, te amo Maitelaguna.

A mi familia: gracias papá por ser un apoyo a pesar de ya no estar en este mundo; gracias mamá por ser mi paciente y darme tu apoyo y comprensión; gracias Nano, por tus risas, por tu interés en mi carrera y por ser mi paciente.

Gracias a toda mi familia, a pesar de que el tiempo y las circunstancias nos han separado, reconozco su herencia en cada gesto que tengo, en mis valores, en mis ideales, en mis conocimientos y, sobre todo, en mi sentido del humor. Atesoro el tiempo que me han dedicado.

Gracias a Erick y a Gaby, porque su amistad y compañía hizo más divertido el transcurso de la carrera, gracias por tantas risas y anécdotas.

Gracias a la Facultad por el aprendizaje en distintos ámbitos y a las personas que me permitieron obtener experiencia clínica al ser mis pacientes. Asimismo, agradezco la experiencia y el conocimiento que me brindó la Clínica Periférica Milpa Alta además de darme la oportunidad de conocer a más personas; gracias amig@s, ustedes saben quiénes son.

Gracias a la Dra. Paty y a la Dra. Laurie Ann por otorgarme la oportunidad de realizar este proyecto y de conocer el ámbito de la investigación. Gracias a quienes hicieron más ameno mi servicio social en el Laboratorio de Genética Molecular: Dra. Arge, Dra. Miryam, Dr. Víctor y Lety. Los admiro mucho.

Gracias a mi empeño y a mi resiliencia que me han llevado hasta este punto de la meta. ¡Lo logré!

1. RESUMEN

La especie vegetal *Jatropha dioica* es utilizada en México como fitoterapia para tratar la movilidad dental al masticar su raíz; sin embargo, su eficacia antimicrobiana ha sido escasamente evaluada. El objetivo del presente estudio fue el de evaluar del efecto antimicrobiano *in-vitro* del extracto de *J. dioica* frente a microorganismos de la biopelícula dental. Evaluación microbiológica por medio de técnica de micro dilución en caldo, a diez concentraciones del extracto de *J. dioica* (30.0 - 0.05mg/ mL) por triplicado y corroboración de viabilidad celular por unidades formadoras de colonia (UFC's), con cultivo bajo anaerobiosis de 10 bacterias (ATCC) de la biopelícula subgingival. Cuantificación por espectrofotometría λ 595 nm (OD595) y comparaciones entre los controles positivos (10^8 células) contra el promedio de las OD595 por dilución. Prueba estadística *T de Student* (paquete estadístico SPSS). Se obtuvieron Concentraciones Mínimas bacteriostáticas para: *Actinomyces viscosus*_ (30.0 mg/mL, UFC's= 52, $p < 0.01$), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b_ (3.75 mg/mL, UFC's= 334, NS), *Capnocytophaga gingivalis*_ (7.0 mg/mL, UFC's= 340, NS), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *Nucleatum*_ (30.0 mg/mL, UFC's= 14, $p < 0.05$), *Parvimonas micra*_ (15.0 mg/mL, UFC's= 2180, $p < 0.01$), *Selenomonas noxia*_ (7.0 mg/mL, UFC's= 25, NS); *Streptococcus sanguinis*_ (15.0 mg/mL, UFC's= 341, NS); y bactericidas para: *C. gingivalis*_ (30.0 mg/mL, UFC's= 0, NS), *Porphyromonas endodontalis*_ (0.05 mg/mL, UFC's= 0, $p < 0.05$), y *Porphyromonas gingivalis*_ (0.05 mg/mL, UFC's= 0, $p < 0.01$). *Prevotella intermedia* presentó resistencia al extracto en las concentraciones evaluadas. Como conclusión, la especie vegetal *J. dioica*, posee propiedades bacteriostáticas y bactericidas para especies patógenas periodontales de la placa subgingival, lo cual infiere la selectividad antibacteriana *in-vitro* del extracto.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales continúan siendo un problema de salud bucal con alta incidencia tanto a nivel mundial como en México (1, 2). El principal factor etiológico de dichas enfermedades es la disbiosis de la biopelícula dental que, junto con la respuesta inmune del hospedero, inician un proceso de destrucción en los tejidos periodontales. Además de los tratamientos periodontales tanto quirúrgicos como no quirúrgicos, existen diversas sustancias que coadyuvan para el control químico de la biopelícula; un ejemplo es el de los antisépticos bucales (3-6). Uno de los antisépticos más utilizados es la Clorhexidina, sin embargo, su uso no debe ser prolongado debido a sus efectos secundarios. Por otro lado, no toda la población mexicana, particularmente gente que viven en comunidades rurales, tiene acceso a terapias periodontales especializadas y mucho menos los ingresos necesarios para la compra de antisépticos debido a sus altos costos en el mercado. La demanda de especies vegetales ha ido incrementando en los últimos años incluyendo aquellos que son necesarios para la higiene bucal, no obstante, es importante que los principios activos de dichas especies tengan fundamento científico (7-11).

El uso medicinal de las plantas para el tratamiento de las enfermedades se define como fitoterapia, de esta forma se denominan fitoquímicos a las sustancias activas derivadas de las especies vegetales que tienen un efecto terapéutico (12, 13). *Jatropha dioica* es una especie vegetal que ha llamado la atención de recientes estudios, debido a sus diversas aplicaciones en la medicina tradicional. En los últimos años se ha demostrado que dicha especie vegetal tiene propiedades antioxidantes y antimicrobianas *in-vitro*, gracias a los diferentes fitoquímicos que

posee; no obstante, *J. dioica* no ha sido probada con bacterias de la biopelícula subgingival (14-20).

El presente estudio presenta las propiedades antimicrobianas del extracto de *J. dioica* contra diez especies bacterianas representativas de la biopelícula subgingival, entre ellas algunas asociadas a las enfermedades periodontales y otras al equilibrio ecológico de la biopelícula dental. El extracto de la especie vegetal fue proporcionado por el laboratorio del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) a cargo de la Dra. Alma Delia Hernández Fuentes quien, junto con su equipo de colaboradores, comprobaron la compatibilidad de la especie, caracterizaron componentes del extracto y evaluaron algunas propiedades del mismo (17), y los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana fueron realizados en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

3. ANTECEDENTES

3.1 BIOPELÍCULAS ORALES

3.1.1 Características de las biopelículas

Las biopelículas son comunidades bacterianas de microorganismos asociados entre sí, donde el crecimiento bacteriano puede ser benéficamente modificado por: la diversidad propia de la comunidad y el medio ambiente modificador (21). Están compuestas por un grupo de diverso de especies bacterianas, las cuales se adhieren a un sustrato de proteínas llamado película adquirida y producen una sustancia polimérica extracelular (EPS), que les brinda protección. Dichas especies constituyen la unidad básica dónde se encuentran organizadas en microcolonias (22, 23). Las biopelículas se encuentran normalmente en la naturaleza, en el cuerpo humano, en la superficie dental y también se forman en las superficies de diversos objetos inanimados. El desarrollo de una biopelícula bacteriana constituye un proceso complejo en el cual se involucran diversos factores como el tiempo, naturaleza del sustrato, condiciones fisicoquímicas del ambiente y características bacterianas específicas (23, 24). Existen 3 fases que explican el proceso de formación de una biopelícula: la primera es la adhesión de las bacterias a la superficie del sustrato; posteriormente se reproducen y se relacionan con otras especies bacterianas (denominado coagregación), en la cual se produce la sustancia polimérica extracelular (EPS) y como última etapa comprende la maduración de la biopelícula, lo cual puede incluir desprendimiento y migración bacteriana dentro de las microcolonias que la conforman (22, 24, 25).

3.1.2 Diversidad de la biopelícula subgingival relacionada con las enfermedades periodontales

Con el avance tecnológico, se han podido realizar investigaciones sobre las enfermedades periodontales y su etiología. Se tiene el conocimiento de que son causadas por un desequilibrio entre las diversas especies bacterianas que forman la biopelícula subgingival y el hospedero (23, 26-31). Socransky y cols. (4) analizaron más de 13,000 muestras de placa dentobacteriana subgingival y mediante el análisis de asociación estadística, agruparon a especies bacterianas que presentaban una relación ecológica más estrecha. La forma y el orden en la cual las bacterias se relacionan, se pueden identificar en una gráfica llamada complejos de la placa dentobacteriana subgingival. Las bacterias agrupadas en los complejos: de *Actinomyces sp.*, morado (*Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula*), amarillo (*Streptococcus sp.*) y verde (*Capnocytophaga sp.* y *Eikenella sp.* entre otras), se consideran colonizadores tempranos o primarios de la superficie dental. La asociación de un mayor número de especies entre los complejos naranja (*Prevotella sp.*, *Fusobacterium sp.* y *Parvimonas sp.* entre otras) y rojo (*Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*), son comúnmente asociados con periodontitis, y a su vez, dichos complejos son conocidos por presentar especies patógenas putativas y patógenas reconocidas respectivamente (figura 1). Existen diversos factores que pueden favorecer la proliferación y disbiosis de las bacterias que se agrupan dentro de dichos complejos, lo cual conducirá al establecimiento de las enfermedades periodontales. Así mismo, la maduración de la biopelícula se encuentra estrechamente relacionada con especies más periodonto patógenas (4, 5).

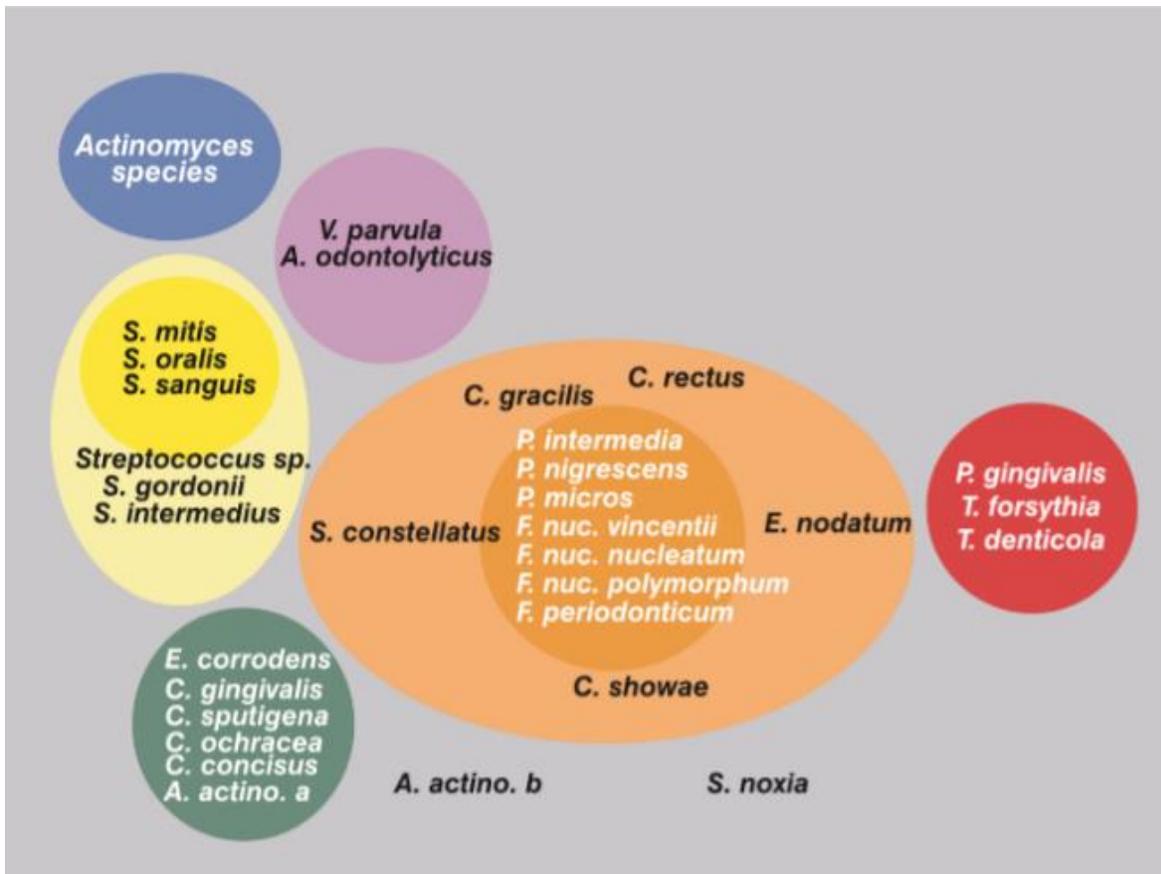


Figura 1. Complejos de la placa subgingival. Las especies bacterianas pertenecientes a los complejos de Actinomyces sp., morado, amarillo y verde, son los primeros en adherirse a la superficie dentaria, de esta forma favorecen la coagregación con los microorganismos del complejo naranja. Estos últimos funcionan como un puente para las bacterias del complejo rojo. Las especies de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b y *Selenomonas noxia* no se agruparon dentro de algún complejo, sin embargo, se asocian con patógenos putativos de colonización tardía con estrecha relación con la periodontitis (12, 13).

La biopelícula dental se encuentra compuesta por alrededor de 700 especies identificadas en microbioma oral humano (32), quienes definen su colonización de acuerdo con las ventanas de infectividad en la primera infancia (<3 años). Dentro de los géneros predominantes de la biopelícula subgingival incluyen: *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Rothia* y *Leptotrichia* (33).

Cuando existe un desequilibrio ecológico entre especies de la biopelícula dental, puede dar origen a infecciones polimicrobianas de carácter endógeno, como son las enfermedades

periodontales. En dichas infecciones no se pueden señalar a una sola especie como el agente etiológico. Sustentable literatura define la etiología de las enfermedades periodontales por grupos específicos de microorganismos que colonizan la placa subgingival, dónde se reconoce como especies periodontopatógenas a: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, además de que diversas especies del esquema de sucesión microbiana de S. Socransky y cols. como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia* entre otras, quienes aumentan en cantidad en la biopelícula subgingival, mientras que en condiciones de salud periodontal predominan especies de los géneros de: *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella* entre otras (5, 34, 35).

3.2 GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

3.2.1 Definición

La gingivitis inducida por la biopelícula es la expresión clínica de un proceso inflamatorio producido por las bacterias que se alojan en el margen gingival. La gingivitis puede evolucionar a periodontitis si el huésped es susceptible y si se expone a factores de riesgo (10). Las enfermedades periodontales y peri-implantares, se definen como infecciones crónicas multifactoriales de carácter inflamatorio, asociadas a la disbiosis de la biopelícula y caracterizadas por procesos de destrucción de los tejidos periodontales, donde se estimula al sistema inmunológico y a su vez, a líneas celulares de destrucción de tejido periodontal (3, 36). Las características endógenas del huésped y el medio ambiente que incluyen el estrés al que sea sometida dicha biopelícula, es lo que determina la severidad de las enfermedades periodontales (5, 23).

3.2.2 Factores de riesgo modificables y no modificables

Existen condiciones que se relacionan o que pueden incrementar el riesgo de desarrollar una enfermedad las cuales se denominan factores de riesgo. Es importante señalar que la periodontitis y su progresión son de naturaleza multifactorial (10, 37). Los factores de riesgo pueden clasificarse de la siguiente forma:

1. Factores de riesgo no modificables. Como edad, género, raza, variaciones polimórficas genéticas que influyen en la respuesta inmune y la virulencia de patógenos asociados naturalmente con la prevalencia y severidad de la enfermedad (5, 10, 37).
2. Factores de riesgo modificables (factores ambientales, de conducta o adquiridos). Dentro de estos factores se encuentran una higiene bucal deficiente, consumo de tabaco, pacientes VIH/SIDA y personas con diabetes mellitus principalmente la que se clasifica como tipo 2 y sobre todo, en aquellos pacientes con un control glicémico deficiente. De igual manera, el consumo excesivo de alcohol aunado a otros factores de riesgo puede incrementar la severidad de las enfermedades periodontales (5, 10, 37).

La obesidad, hipertensión, osteopenia y la osteoporosis también se consideran factores de riesgo endógeno, así como las condiciones socioeconómicas, psicosociales y el nivel de educación en prevención para la salud (5, 10, 37).

3.2.3 Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones peri-implantares

El sistema inmune en el periodonto trabaja a nivel basal debido a que las bacterias de la biopelícula subgingival siempre estarán presentes; no obstante, la persistencia de las células del sistema inmunológico van de la mano del aumento de especies periodonto patógenas de la

biopelícula dental, lo cual lleva al aumento de mediadores de la inflamación, conocidas como citocinas, y a su vez llevan al aumento de moléculas que activan líneas de destrucción de los tejidos de soporte del diente, como son las metaloproteinasas, especies reactivas del oxígeno (ROS), Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) y osteoclastos. Las enfermedades periodontales, así como la mucositis periimplantaria y la peri-implantitis, son el resultado clínico del proceso inflamatorio ante la disbiosis de la biopelícula subgingival aunado a factores de riesgo (4, 5, 23, 36, 38-40).

La salud periodontal comprende las siguientes características: encía sin signos de edema, eritema y/o supuración; profundidad al sondeo no mayor a 3 mm y libre de sangrado, sin signos radiográficos de pérdida ósea y una movilidad dental fisiológica. Estas características son el resultado de la homeostasis entre el sistema inmune del periodonto y la biopelícula subgingival (39). Si dicha homeostasis es alterada se expresarán signos clínicos como hinchazón, edema y/o eritema gingival, para el caso de gingivitis y; pérdida de inserción y/o de hueso, con o sin presencia de movilidad dental, para las periodontitis (39, 41, 42).

La clasificación actual de las enfermedades periodontales, establecida por la Academia Americana de Periodontología y por la Federación Europea de Periodontología (Tabla 1), se basa en el sangrado al sondeo para establecer el diagnóstico de gingivitis asociada a la biopelícula; si este es $\geq 10\%$ de los sitios evaluados se considerará gingivitis localizada y si el resultado es $\geq 30\%$ será gingivitis generalizada (43, 44).

En cuanto a las periodontitis, dicha clasificación establece cuatro etapas de acuerdo con la severidad y la complejidad del tratamiento para cada una de ellas. Además, es necesario establecer su extensión pudiendo ser localizada, generalizada o distribución inciso-molar. Finalmente se agrega alguno de los grados propuesto (A, B o C) el cual tiene el objetivo de evaluar los factores de riesgo del paciente, así como la posible respuesta al tratamiento periodontal (45, 46).

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales.

Salud periodontal, enfermedades y condiciones gingivales			Periodontitis			Otras condiciones que afectan el periodonto				
Salud periodontal y salud gingival	Gingivitis: inducida por la biopelícula dental	Enfermedades gingivales: no Inducidas por la biopelícula dental	Enfermedades periodontales necrotizantes	Periodontitis*	Periodontitis como una manifestación de enfermedades sistémicas	Enfermedades sistémicas o condiciones que afectan los tejidos de soporte periodontal	Abscesos periodontales y lesiones endodóntico-periodontales	Deformaciones y condiciones mucogingivales	Fuerzas oclusales traumáticas	Factores relacionados con restauraciones protésicas y dentales

Esta clasificación se basa en la fisiopatología de las enfermedades periodontales, de esta forma divide aquellas que son inducidas por la biopelícula de las que son consecuencia de condiciones sistémicas. Además, separa los diagnósticos tomando en cuenta si el paciente presenta un periodonto intacto, un periodonto reducido sin antecedentes de enfermedad periodontal o un periodonto reducido en pacientes con tratamiento periodontal previo. * Periodontitis generalizada >30%. Copiada y traducida de G. Caton, 2018 (45).

3.3 TERAPIA PERIODONTAL ANTIMICROBIANA

El tratamiento base de las enfermedades periodontales consiste en eliminar la carga bacteriana de los sitios con mayor daño a los tejidos de soporte del diente, ya sea mediante el tratamiento no quirúrgico (fase I) o quirúrgico (fase II). Existen diversos quimioterapéuticos antimicrobianos que pueden aumentar la efectividad de los tratamientos periodontales como los antibióticos, así como los antisépticos contra la placa dental, sin embargo, ninguno tiene efectividad selectiva para las especies patógenas periodontales de la biopelícula (6, 10, 47).

3.3.1 Terapias antimicrobianas contra las biopelículas orales

Prescribir antibióticos como parte de la terapia periodontal, es una decisión que debe ser evaluada detalladamente por un especialista, puesto que es necesario considerar diversos factores, entre ellos, la probabilidad de inducir resistencia bacteriana. Dentro de los antibióticos más usados para la terapia periodontal se encuentran: amoxicilina, con o sin ácido clavulánico, doxiciclina, tetraciclina, clindamicina, metronidazol y ciprofloxacina. Para que un agente antimicrobiano sea eficaz en el tratamiento periodontal, este debe tener una concentración alta adyacente a los tejidos periodontales, ya que es importante que los antibióticos presenten niveles registrables en el fluido crevicular, sin embargo, la concentración del antibiótico difícilmente llegará dentro de las biopelículas sin antes realizar terapia biomecánica para su remoción (10, 48). Por lo tanto, dadas las características de las biopelículas orales, y que el uso de antimicrobianos contra la placa dental, son en su mayoría inespecíficos, el eliminar por completo la microflora, no es un contribuyente para lograr la homeostasis oral (6, 21, 47, 48).

3.3.2 Control químico de la placa dentobacteriana

Los agentes químicos contra la biopelícula dental interfieren sobre los microorganismos de forma cuantitativa, sin embargo, ninguno de forma selectiva. Se encuentran en diferentes presentaciones como enjuagues bucales, geles y pastas (37, 49). Es importante considerar, al momento de prescribir biocidas contra la placa dental, su eficacia, sustentividad, baja toxicidad, especificidad, evitar crear resistencia bacteriana, el costo o accesibilidad a ellos de poblaciones marginadas y, por supuesto, los efectos adversos (6, 49). Por ejemplo, la clorhexidina es uno de los agentes contra la biopelícula dental comúnmente utilizados; dependiendo de su concentración esta puede ser bactericida o bacteriostático. Sin embargo, dicho antiséptico no puede ser utilizado por tiempos prolongados debido a que incrementa la posibilidad de efectos adversos como: pigmentación dental, en restauraciones y mucosas, así como disgeusia, entre otros (10).

En la tabla 2 se describen algunos de los antisépticos contra la placa dental clasificadas de acuerdo con su estructura química y el costo aproximado en la presentación más común.

Tabla 2. Agentes antimicrobianos contra la biopelícula dental agrupados de acuerdo con su estructura química.

Clasificación química	Ejemplos	Marcas comerciales / costos
Fenoles y aceites esenciales:	Timol, hexilresorcinol, eucaliptol, triclosán.	Listerine Cuidado Total® 500 ml \$72.00
Antisépticos bisguanídicos:	Clorhexidina, alexidina, octenidina.	Enjuague Oral B® para gingivitis 350 ml \$208.00 Bexident® encías colutorio ISDIN 250 ml \$375.00
Fluoruros:	Sódico, monofluorofosfato sódico, fluoruro estañoso, fluoruro de amino.	Enjuague Colgate® Plax whitening zero alcohol 500 ml \$99.00
Compuestos de amonio cuaternario:	Cloruro de cetilpiridino	Enjuague Oral B® Pro-Salud multi protección menta fresca 500 ml \$78.00
Agentes oxidantes:	Peróxido de hidrógeno, peroxiborato sódico	Enjuague Oral B® 3D White brilliant fresh 473 ml \$85.00

La clasificación fue obtenida de Bascones y col. (49). Los precios fueron extraídos de un sitio web comercial en México consultados en 2021, por lo que pueden variar dependiendo del lugar donde sean adquiridos.

3.4 FITOTERAPIA

El uso medicinal de las plantas, para el tratamiento de las enfermedades se define como fitoterapia. La aplicación de las plantas puede ser directa a partir de alguno o algunos de sus componentes (hoja, flor, tallo o raíz) o como un extracto que se obtiene mediante un procedimiento físico y/o químico con una o más de las estructuras de las plantas ya mencionadas (12). Las plantas producen diversas sustancias las cuales se involucran con su metabolismo, repuesta de defensa, adaptación al del medio ambiente e incluso con la competencia entre especies. Las sustancias activas derivadas de plantas que tienen un efecto medicinal se denominan fitoquímicos (13).

3.4.1 Plantas medicinales aplicadas en la cavidad bucal

El uso empírico de plantas para tratar padecimientos bucales está basado en un conocimiento antiguo y su extensa aplicación principalmente en comunidades rurales, ha llamado la atención de investigadores para así estudiar las propiedades de diversas plantas (8, 50). De las especies que se han analizado, algunas han demostrado tener efecto sobre la placa dental, inclusive de manera selectiva contra especies que juegan un papel importante en la etiología de la caries, la gingivitis y periodontitis, e incluso para disminuir el dolor dental o aquel causado por úlceras en mucosa oral (8). En la tabla 3 se describen algunas de las especies vegetales que cuentan con evidencia científica para determinados padecimientos bucales.

Tabla 3. Especies vegetales utilizadas en fitoterapia bucal.

Nombre científico	Resultados experimentales
Aloe vera (L.) Burm.f.*	Reducción de la inflamación gingival (51), reducción en sangrado gingival e índices de placa (52), reduce significativamente los niveles de placa (53).
<i>Haematoxylon brasiletto</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Amphipterygium adstringens</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Cinnamomun zeylanicum</i> .	Efectos inhibitorios contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> , asimismo exhibieron efectos bactericidas en dosis elevadas (54).
<i>Theobroma cacao</i> L.*	Actividad antimicrobiana contra <i>S. mutans</i> similar a la clorhexidina (55).
<i>Jatropha dioica</i>	Se determinó la concentración mínima inhibitoria contra <i>S. mutans</i> la cual es de 2 mg/ml (17).
<i>Malacomeles denticulata</i>	Mostró efectos antimicrobianos contra distintas bacterias relacionadas periodontopatógenas (56).

*Especies vegetales probadas en ensayos clínicos.

3.5 *Jatropha dioica*

3.5.1 *Taxonomía y distribución geográfica*

J. dioica es un subarbusto o arbusto perenne, escasamente leñoso que va desde los 30 hasta los 150 centímetros de altura. Generalmente forman colonias, debido a sus rizomas, de los cuales salen raíces y tallos semi leñosos que se dirigen al exterior, estos tallos son flexibles y de coloración negro-rojizo. Las hojas son deciduas, aparecen únicamente en la época de lluvias y a un costado de estas se desarrollan las flores. En cuanto a la época de floración, esta comprende los meses de abril y mayo. También presenta frutos los cuales son pequeños, asimétricos y globosos (15, 19).

La especie se encuentra clasificada dentro del dominio *Eukarya*, pertenece a la división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida* y orden *Euphorbiales*. Es comúnmente conocida como “Sangre de drago”. La razón de este nombre se debe a que el látex, contenido dentro de sus rizomas, se torna color rojo al tener contacto con el aire (15, 19, 57). *J. dioica* se distribuye ampliamente en regiones áridas y semiáridas abarcando los estados de Chihuahua, Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Zacatecas, y Durango en México y; Arizona, Nuevo México y Texas en Estados Unidos de Norteamérica (19, 20).

3.5.2 *J. dioica en la medicina tradicional*

Las aplicaciones terapéuticas que se le han dado a *J. dioica* pueden cambiar dependiendo de los conocimientos que posean las comunidades de cada estado o región; asimismo, la forma en la que se llevan a cabo los remedios puede variar (11, 14, 15, 17, 19). Dentro los usos tradicionales para enfermedades bucales destacan: masticar o preparar una infusión del rizoma de la planta para prevenir o tratar la movilidad dental, el sangrado de

enciás y/o aliviar el dolor dental; así como la aplicación directa del látex (proveniente del rizoma) sobre las vesículas causadas por herpes con el fin de aliviar los síntomas (11, 15, 17).

3.5.3 Evaluación de los componentes y propiedades de J. dioica

Los componentes y las propiedades de *J. dioica* han sido estudiados en años recientes a partir de extractos. Dichas características pueden variar en cantidad dependiendo de la metodología con la cual se haya obtenido el extracto y debido a los ensayos a los cuales sea sometido para su análisis, siendo el más común la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Los componentes se han encontrado los siguientes: alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos (14, 15, 17-19).

Las concentraciones de sus componentes también dependen de diversos factores, incluyendo las tensiones ambientales de la planta, la edad, la susceptibilidad individual, las diferentes partes de la planta (raíz, tallo, hojas y semillas) y la temporada del año, así como la zona de recolección (14, 19).

De las propiedades que se han evaluado con resultados positivos se encuentran sus efectos antioxidantes, quimio protectores y antimicrobianos (15-17, 20). Además, Araujo Espino y cols. (58) concluyeron que *J. dioica* no ejerce ningún efecto citotóxico o genotóxico en la sangre periférica de ratones, incluso en dosis elevadas. De igual manera Silva Belmares y cols. (16) evaluaron la citotoxicidad de un extracto a base de hexano en células epiteliales de cerdo, hepatocitos humanos y en células epiteliales de zarigüeya; los resultados probaron que *J. dioica* no presenta citotoxicidad significativa en dichas células.

3.5.4 *J. dioica* como terapia antimicrobiana

Se reporta escasa literatura que evalúe las propiedades antimicrobianas de extractos de *J. dioica*. Sin embargo, se reconocen sus propiedades antimicrobianas debido a la presencia de sus metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos (16, 17, 19). Silva Belmares y cols. (16) evaluaron extractos de la raíz de *J. dioica* y confirmaron su acción antimicrobiana contra especies como: *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. De igual forma dos estudios similares (17, 18) concluyeron que *J. dioica* posee propiedades antibacterianas contra *Streptococcus mutans*; además, uno de los reportes (17) determinó la concentración mínima inhibitoria de 2 mg/ml contra dicho microorganismo. Sin embargo, no existe evidencia de estudios que evalúen a la especie vegetativa contra especies microbianas representativas de las biopelículas dentales.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades periodontales tienen una prevalencia considerable tanto a nivel mundial como en la población mexicana. De acuerdo con los resultados obtenidos en 2019 por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB), de una muestra de 131, 903 mexicanos, el 59.2% presentaba al menos uno de los signos de las enfermedades periodontales (1, 2, 10). Desafortunadamente, en México no todas las personas que tienen padecimientos bucales tienen acceso a terapias especializadas como es la periodontal, debido a su poder adquisitivo en ingresos per cápita. En zonas rurales diversas comunidades de bajos recursos como es en la región de la Misión Chichimeca en el municipio de San Luis de la Paz en Guanajuato, optan por utilizar la fitoterapia como alternativa a sus padecimientos bucales, a pesar de no tener sustento científico el uso de la mayoría (7, 8, 11). México ocupa el segundo lugar a nivel mundial, con un registro de 4000 especies vegetativas, considerando el 15% de la flora total del país, adicionalmente, cuenta con diversas plantas medicinales con fines terapéuticos que ofrecen una alternativa para la actuales demanda del uso de productos naturales (59). La especie vegetal *J. dioica* es utilizada en la medicina tradicional mexicana lo cual justifica los trabajos de investigación que se han realizado en los últimos años para conocer sus propiedades, entre las cuales destacan las antioxidantes y antibacterianos (11, 17, 57). Sin embargo, la literatura carece de estudios referentes a sus propiedades antimicrobianas contra especies de la biopelícula dental, por lo cual es de suma importancia su evaluación antimicrobiana *in-vitro*. De esta manera, podría ser considerada como coadyuvante al control de la placa dental para el tratamiento periodontal, sobre todo en zonas rurales de nuestro país con escasos recursos.

5. HIPÓTESIS

El extracto de *J. dioica* tiene efectos antimicrobianos selectivos contra microorganismos de la biopelícula dental, con la técnica de microdilución en caldo, con inhibición de su viabilidad corroborada con unidades formadoras de colonia (UFC's).

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar del efecto antimicrobiano *in-vitro* del extracto de *J. dioica* frente a microorganismos de la biopelícula dental, por medio de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por medio con la técnica de micro dilución en caldo, con inhibición de su viabilidad corroborada con UFC's.

6.2 Particulares

1. Establecer la susceptibilidad antimicrobiana de diez especies representativas de la biopelícula dental, frente al extracto de *J. dioica*.
2. Establecer la concentración mínima inhibitoria de *J. dioica* a la concentración máxima de 30 mg/ ml y diez diluciones seriadas 1:1, frente a diez microorganismos de la biopelícula dental asociados con salud y con periodontitis, por medio de la técnica de microdilución en caldo.
3. Corroboración de viabilidad celular por UFC's de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en caldo en cultivos bajo anaerobiosis.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo:

- Cámara de Anaerobiosis marca COY
- Espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Modelo 6131
- Lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices)
- Contador de colonias manual
- Estereomicroscopio binocular Fisherbrand
- Agitador magnético
- Sonicador
- Autoclave Cristófoli
- Micropipetas unicanal
- Micropipeta multicanal Eppendorf
- Plataforma de agitación

Reactivos:

- Agua desionizada
- Caldo de *Mycoplasma*
- Tripticasa Soya Agar (TSA)
- Caldo de Infusión Cerebro Corazón (ICC)
- Solución de hemina al (0.05%)
- Menadiona (vitamina K) al (0.005%)
- Sangre de carnero desfibrinada
- Solución de Amoxicilina 1 mg/ mL

- Buffer Trizma-EDTA pH 7.6 (0.372 g - EDTA (1 mM), 1.576g - Trizma® hydrochloride (10 mM)
- Tanque de mezcla (80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂)

Material:

- Tubos para centrifuga cónicos de 15 ml Corning™ Falcon™
- Placa de 96 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno)
- Película elástica Reynolds
- Microtubos de 1.5 mL

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1.1 Generalidades

El extracto en crudo de *J. dioica* fue proporcionado por el laboratorio del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la UAEH a cargo de la Dra. Alma Delia Hernández Fuentes, quién caracterizó previamente la compatibilidad de la especie y sus compuestos (17). En el presente proyecto de investigación se evaluaron las propiedades antimicrobianas del extracto, mediante pruebas de susceptibilidad antibacteriana a distintas concentraciones (diez diluciones seriadas 1:1), contra 10 especies bacterianas representativas de la biopelícula subgingival, por el método de la técnica de micro dilución en caldo con corroboración de viabilidad celular por UFC's.

7.1.2 Variables independientes

1. Densidad óptica (OD) a longitud de onda (λ) de 600 nm, y dilución 1:10 por especie bacteriana evaluada, para los controles positivos.

2. OD de controles negativos (medio de cultivo sólo) a λ de 595 nm (OD595).
3. OD595 de controles de Inhibición bacteriana con amoxicilina y cada cepa (10^8 células).
4. OD595 del extracto sin bacteria en cada concentración evaluada (diluciones 1:1, de 30 - 0.05 mg/ mL).

7.1.3 Variables dependientes

1. OD por especie bacteriana evaluada a diez diluciones seriadas 1:1 (30.0, 15.0, 7.5, 3.75, 1.87, 0.93, 0.46, 0.23, 0.11 y 0.05 mg/mL) de *J. dioica*, por triplicad.
2. Unidades Formadoras de Colonia por especie evaluada de los resultados de micro dilución en caldo, derivado de los cultivos por cada dilución seriada 1:1 (30 - 0.05 mg/mL).

7.1.4 Criterios de selección

Se seleccionaron diez cepas bacterianas provenientes del cepario del Laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI de la FO, UNAM, bajo el certificado de Norma ISO:9001:2015 Sistemas de gestión de la calidad. Se descartó cualquier medio de cultivo que no cuente con las características de cepa pura por cultivo anaerobio en estría triple (Tabla 4).

Tabla 4. Especies microbianas elegidas para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

Especie	ATCC	Complejo*
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	<i>Actinomyces</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> stp. <i>b</i>	43718	Otro
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Verde
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	25586	Naranja
<i>Parvimonas micra</i>	33270	Naranja
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Rojo
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Otro
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Naranja
<i>Selenomonas noxia</i>	43541	Otro
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Amarillo

*Agrupación de especies bacterianas de la biopelícula subgingival de acuerdo con los complejos de la placa subgingival de Socransky y col. (4, 5)

7.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Los rizomas de *J. dioica* fueron recolectados durante el mes de febrero de 2017 (temporada de sequía), en el Municipio de Morelos, Zacatecas. Fueron identificados y preservados en el herbario de la UAEH. Posteriormente se conservaron en ultracongelación a -70°C (ThermoScientific703Ultra-LowFreezer, GrandIsland, NY, USA) para ser liofilizados (Model 79480 LABCONCO, Kansas City, MO, USA) y almacenados bajo refrigeración a 5°C previo a su uso. Para la extracción se utilizó etanol al 70% como solvente en un radio de 1:5 (rizoma/solvente). La fracción líquida fue filtrada usando papel filtro (Whatman n° 5) y enseguida se evaporó el solvente en un rotavapor (BüchiR-215, Flawil, Switzerland) a 50°C al vacío. La porción sólida se recuperó y se disolvió, para su análisis fitoquímico y microbiológico, con agua destilada a una concentración de 0.2-5 mg de extracto/mL, para su completa disolución se utilizó un baño de ultrasonido a 30°C por 20 min (Ultrasonic Cleaner, Mod. 32V118A, Freeport, IL, USA) (17).

7.3 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

7.3.1 Especies bacterianas y condiciones de cultivo

Las especies bacterianas que se emplearon en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron crecidas con protocolos estandarizados de cultivo microbiano anaerobio, a partir de cepas adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) (Tabla 4). Todas las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido: 20g Tripticasa soya agar (TSA), 5 mL solución stock de Hemina, 500 mL agua destilada UV/UF, 5 mL Menadiona (vitamina K), 25 mL sangre de carnero desfibrinada, a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ para su posterior cuantificación por espectrofotometría. Las cepas bacterianas utilizadas en cada ensayo se ajustaron a OD 1 con espectrofotómetro (Eppendorf) a una $\lambda = 600 \text{ nm}$ ($\text{OD}_{1 \text{ 600 nm}} = 10^9$ células) y con una posterior dilución decimal (1:10) para ajustar a 10^8 células bacterianas, con caldo de Infusión Cerebro Corazón (ICC), simple o enriquecido para cepas que así lo requirieron.

7.3.2 Dilución, esterilización y OD del extracto.

El extracto fue diluido en agua desionizada a una concentración de 30 mg/ml, para su completa disolución se mezcló en un agitador magnético con sonicación intermitente. Posteriormente fue esterilizado a 121°C por 20 min a 1 atmósfera de presión (Autoclave Cristófoli). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas a partir de la concentración máxima 30 mg/mL - 0.05 mg/ mL y finalmente, se colocaron 50 μl de cada concentración en una placa de 96 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno) por triplicado, para así obtener la OD₅₉₅, mediante un lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices).

7.3.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

En placas de 96 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno) se colocaron 100 µl de cada una de las concentraciones del extracto (30 - 0.05 mg/ mL) y 100 µl de cada especie bacteriana seleccionada (Tabla 4), por triplicado para cada ensayo (Figura 2). Como controles positivos (+) se agregaron 100 µl de la cepa (10^8) y 100 µl del caldo de medio de ICC; para los controles de inhibición negativa (-) se agregaron 100 µl de cepa y 100 µl de amoxicilina (concentración 1 mg/ mL) y como control negativo 200 µl de caldo de sin cepa (ver Figura2). Se incubaron en cámara de anaerobiosis durante 120 H, en plataforma de agitación a 160 rpm, a las condiciones especificadas previamente. Después de ese período de tiempo se colocaron 50 µl de cada pozo en una placa nueva y ésta se cuantificó con un lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices) a una $\lambda = 595$ nm. Además, se tomaron 10 µl de cada uno de los pozos de cada concentración y de los controles positivo y negativos, para diluirlos con 90 µl de Buffer Trizma-EDTA pH 7.6 (0.372 g - EDTA (1 mM), 1.576g - Trizma® hydrochloride (10 mM) y 1 L - agua destilada UV/UF). Posteriormente se sembraron 100 µl de la dilución (1:10) de cada concentración del extracto evaluada, así como de los controles, para corroborar la viabilidad celular en agar enriquecido bajo condiciones de anaerobiosis (previamente especificados) durante 7 días.

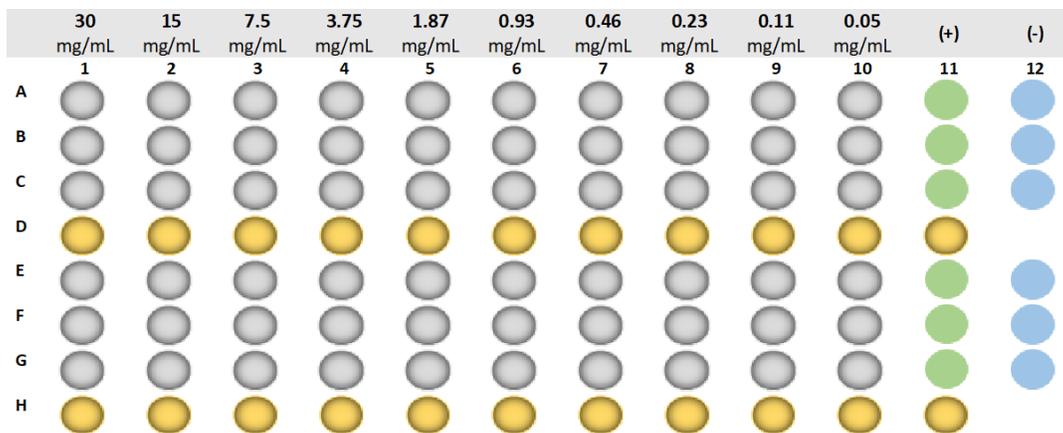


Figura 2. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana por Concentraciones Mínimas Inhibitorias en caldo. Placa de 96 pozos que describen: filas A-C extracto en concentraciones de 30 mg/ mL a 0.05 mg/ mL más 100 µl de especies bacterianas a analizar, por triplicado (filas E, F y G). Los círculos de color amarillo indican los controles negativos. Los símbolos (+) y (-) representan los controles positivos (círculos verdes) y controles de inhibición negativa (círculos azules) respectivamente.

7.3.4 Análisis de datos

Para el análisis de los resultados, se cuantificaron las OD595 mediante lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices). Cada una de las lecturas fue calculada con: la lectura correspondiente de cada ensayo, restando la OD595 del extracto sin bacteria en cada concentración evaluada (diluciones 1:1, de 30 - 0.05 mg/ mL).

Los resultados fueron promediados por triplicado y comparados en par con respecto al promedio de los controles positivos, por cepa individual, por medio de la prueba estadística paramétrica *T de Student*, con paquete estadístico SPSS y ajuste de comparaciones múltiples por triplicado, con ICC al 95%.

La corroboración viabilidad por conteo de Unidades Formadoras de Colonia, fue realizada con un contador de colonias y estereomicroscopio (Fisherbrand™). Todos los datos tanto de OD595 como de UFC's fueron capturados en una base de datos en Excel

dónde se graficaron las medias y el error estándar de la media de cada ensayo y se colocaron las significancias obtenidas.

Adicionalmente, para la recuperación de Unidades Formadoras de Colonia, se realizó el conteo manual de las colonias visibles con un contador manual y estereomicroscopio (Fisherbrand™). Los resultados obtenidos se interpretaron como Concentración Mínima Bacteriostática para la concentración mínima dónde se registró la disminución visible con crecimiento contable de colonias; Concentración Mínima Bactericida para el crecimiento negativo de UFC's; y resistencia bacteriana para el crecimiento positivo no contable de UFC's (+) de acuerdo con la literatura reportada (60).

8. RESULTADOS

8.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

El extracto de *J. dioica* recibido en el Laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI de la FO, UNAM por parte de la UAEH, presentó una consistencia en pasta misma que fue diluida a la concentración de 30 mg/ mL y esterilizada por autoclavado para posteriormente realizar las diluciones seriadas requeridas (1:1). El extracto diluido presentó un color café claro y al ser esterilizado, cambió a un matiz ámbar oscuro. Debido a que el extracto presentó una densidad propia, se tomó la longitud de onda de las distintas diluciones seriadas, para podersele restar a los ensayos de susceptibilidad antibacteriana. La Tabla 5 presenta las OD595 del extracto a 10 diluciones (30-05 mg/ mL). Concordante con cada concentración, la OD595 disminuye en cada dilución seriada.

Tabla 5. Densidad Óptica de extracto a las distintas concentraciones evaluadas.

	30.0 mg/mL	15.0 mg/mL	7.5 mg/mL	3.75 mg/mL	1.87 mg/mL	0.93 mg/mL	0.46 mg/mL	0.23 mg/mL	0.11 mg/mL	0.05 mg/mL
Fila A	0.066	0.063	0.052	0.050	0.050	0.045	0.044	0.043	0.042	0.044
Fila B	0.064	0.058	0.051	0.050	0.050	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043
Fila C	0.063	0.062	0.050	0.050	0.050	0.045	0.044	0.043	0.042	0.043
Media	0.064	0.061	0.051	0.050	0.050	0.045	0.044	0.043	0.042	0.043

Mg: miligramos; mL: mililitro; Filas A-C: triplicado.

8.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Los ensayos de susceptibilidad antibacteriana para cada una de las especies representativas de la biopelícula subgingival, se mostrarán a continuación con las evaluaciones que muestran los valores de OD595, la N por triplicado en cada ensayo. La corroboración de la viabilidad por UFC's y el Error Estándar de la Media de cada una de ellas, son representadas, además de las comparaciones estadísticas con respecto al control positivo de cada cepa, con ajuste de comparaciones múltiple (Tablas 6 – 15). Adicionalmente se presenta la representación gráfica de cada ensayo, avaluado por cepa bacteriana (Figuras 3-12) y la representación gráfica de todas las evaluaciones a la concentración máxima del extracto (Figura 13).

La especie colonizadora primaria *A. viscosus*, presentó susceptibilidad antimicrobiana a bajas concentraciones y a la máxima concentración: 0.05 mg/mL (UFC's= 224, NS); 0.11 mg/ mL (UFC's= 311, NS); y 0.30 mg/ mL (UFC's= 52, $p < 0.01$); al ser la máxima concentración dónde se presentó el número menor de UFC's con diferencias significativas respecto al control positivo (Control +: 0.155 vs. 0.030, OD595), por lo que se considera a 30 mg/ mL como la Concentración Mínima Bacteriostática para dicha especie. Cabe mencionar que *A. viscosus* es considerada compatible con estados de salud periodontal en la biopelícula subgingival.

Tabla 6. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Actinomyces viscosus*.

<i>A. viscosus</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.155	0.036	0.063	0.104	0.102	0.046	0.050	0.090	0.133	0.118	0.088	0.030
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	224	311	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	52
EEM	0.009	0	0.026	0.020	0.035	0.013	0.006	0.034	0.041	0.025	0.003	0.004
T de Student	-	*	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	†

A. viscosus: *Actinomyces viscosus*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC's: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

Para el resto de las diluciones probadas con *A. viscosus*, el crecimiento bacteriano fue no contable, a pesar de que de que en el análisis estadístico la concentración de 0.46 mg/ mL mostró reducción significativa en su OD595, la recuperación de viabilidad en UFC's corrobora la resistencia al extracto a dicha concentración. Por otro lado, la densidad óptica de amoxicilina presentó diferencias significativas respecto al Control positivo (Control +: 0.155 vs. 0.036, OD595, $p < 0.05$), con crecimiento negativo en las UFC's. Las OD595 de cada dilución se presentan en la tabla 6 y figura 3.

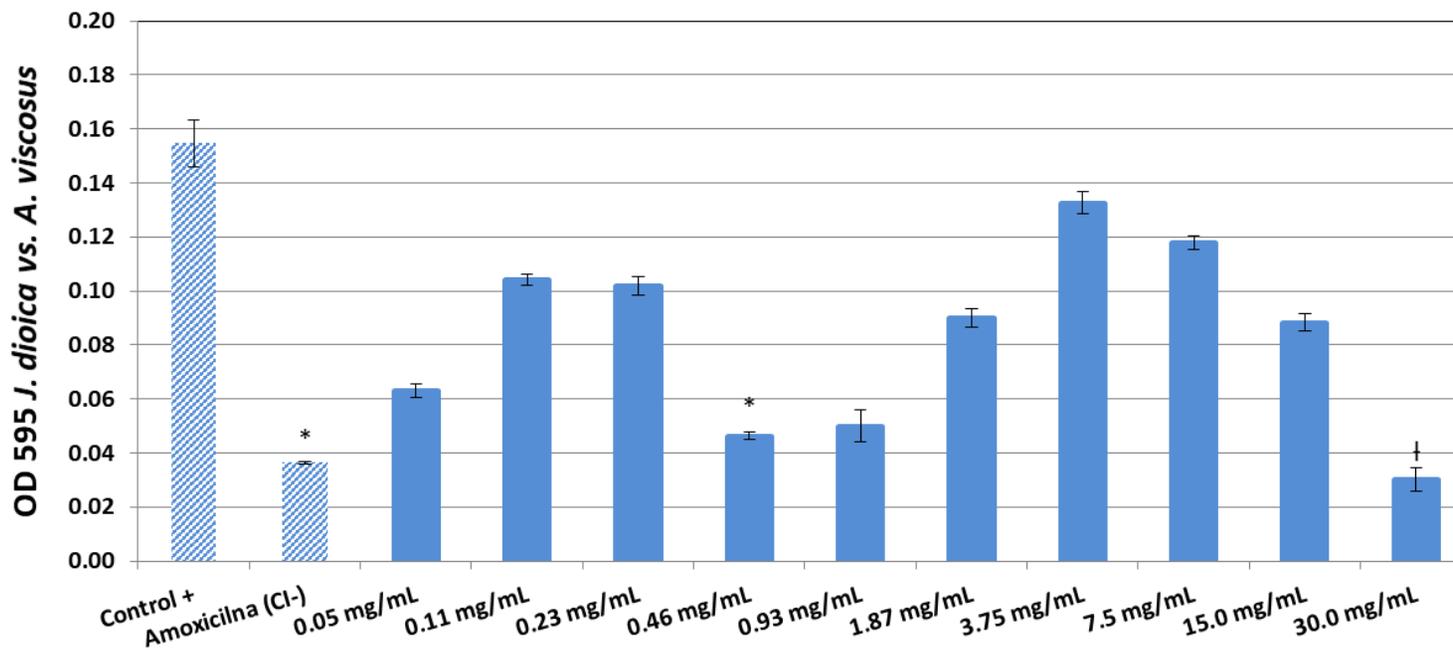


Figura 3. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Actinomyces viscosus*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*).

En los ensayos con la especie colonizadora tardía *A. actinomycetemcomitans* stp. b., o también considerada patógena putativa periodontal, se pudo observar un patrón en la reducción de OD595 presente en todas las concentraciones evaluadas con respecto al control positivo. Sin embargo, presentó susceptibilidad antibacteriana bacteriostática únicamente en las cuatro concentraciones mayores del extracto, corroborado con las UFC's cuantificables (Tabla 7).

Tabla 7. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. *b*.

<i>A. a. b</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.051	0.035	0.010	0.012	0.005	0.012	0.018	0.021	0.018	0.035	0.015	0.020
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	NC	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	334	1	1	2120
EEM	0.001	0	0.002	0.005	0.003	0.003	0.005	0.009	0.005	0.002	0.005	0.001
T de Student	-	†	†	NS	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS

A. a. b: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b.; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC's: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

En las concentraciones de 3.75 a 30 mg/ mL se pudo realizar el conteo de UFC's registrando el menor número para 7.0 y 15.0 mg/ mL con el mismo resultado en ambas (UFC's= 1, NS), lo cual corrobora la Concentración Mínima Bacteriostática de *J. dioica* a 3.75 mg/ mL contra *A. actinomycetemcomitans* stp. *b*. al ser la concentración más baja que demostró disminuir visiblemente el crecimiento bacteriano (UFC's=334, NS). Las significancias en densidades ópticas registradas en el análisis estadístico se presentaron en las concentraciones: 0.05 mg/mL (UFC's= +, $p < 0.01$), 0.23 mg/ mL (UFC's= +, $p < 0.05$), y 0.46 mg/ mL (UFC's= +, $p < 0.05$) además del control de inhibición negativa con amoxicilina (UFC's= 0, $p < 0.01$). Lo cual sugiere que la reducción en la densidad óptica no necesariamente indica que pueda haber efectividad sobre la viabilidad celular, si no es hasta que se corrobora con el crecimiento negativo en UFC's, ya

que todas las densidades ópticas fueron menores respecto al control positivo. Las medias de OD595 se presentan en la tabla 7 y figura

4.

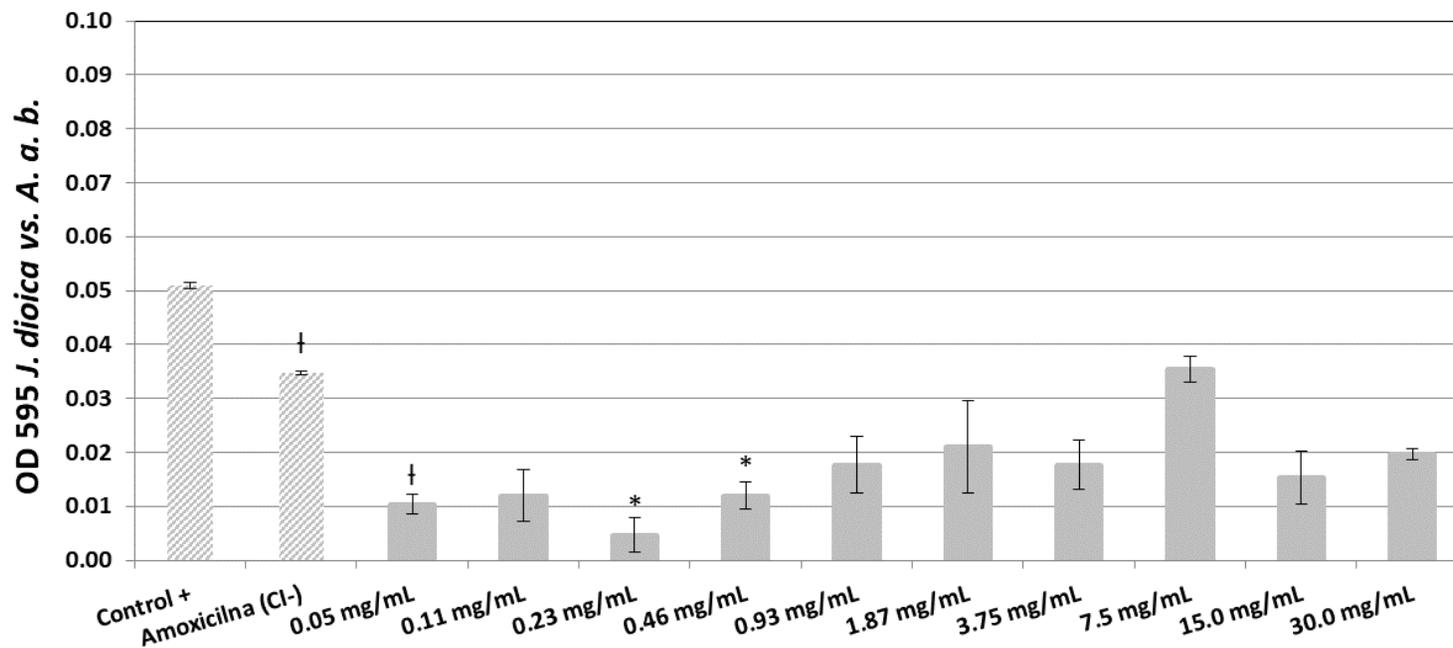


Figura 4. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo *b*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*).

Concordante con los resultados previos, para la especie colonizadora temprana *C. gingivalis* la inhibición del extracto fue efectiva en concentraciones de 7.0 mg/mL (UFC's= 340, NS) y 15.0 mg/ mL (UFC's= 759, NS). En cambio, a la concentración máxima del extracto no se registró crecimiento bacteriano (tabla 8); por lo tanto, se establece como Concentración Mínima Bacteriostática a 7.0 mg/ mL y como Concentración Mínima Bactericida, a 30 mg/ mL.

Tabla 8. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Capnocytophaga gingivalis*.

<i>C. gingivalis</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.046	0.039	0.003	0.002	0.004	0.007	0.014	0.012	0.013	0.026	0.008	0.026
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	340	759	0
EEM	0.001	0	0.002	0.002	0.001	0.001	0.003	0.002	0.004	0.005	0.019	0.005
T de Student	-	*	*	†	†	†	†	*	NS	NS	NS	NS

C. gingivalis: *Capnocytophaga gingivalis*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

Los valores de las OD595 en todas las concentraciones probadas contra *C. gingivalis* se encuentran por debajo del control positivo registrando resultados estadísticamente significativos para las concentraciones: 0.05 mg/mL (UFC's= +, $p < 0.05$); 0.11, 0.23, 0.46, 0.93

mg/ mL (UFC's= +, $p<0.01$); y 1.87 mg/ mL (UFC's= +, $p<0.05$) no obstante, los crecimientos en agar exhibieron un crecimiento bacteriano no contable en dichas concentraciones. Las OD595 se presentan en la tabla 8 y figura 5.

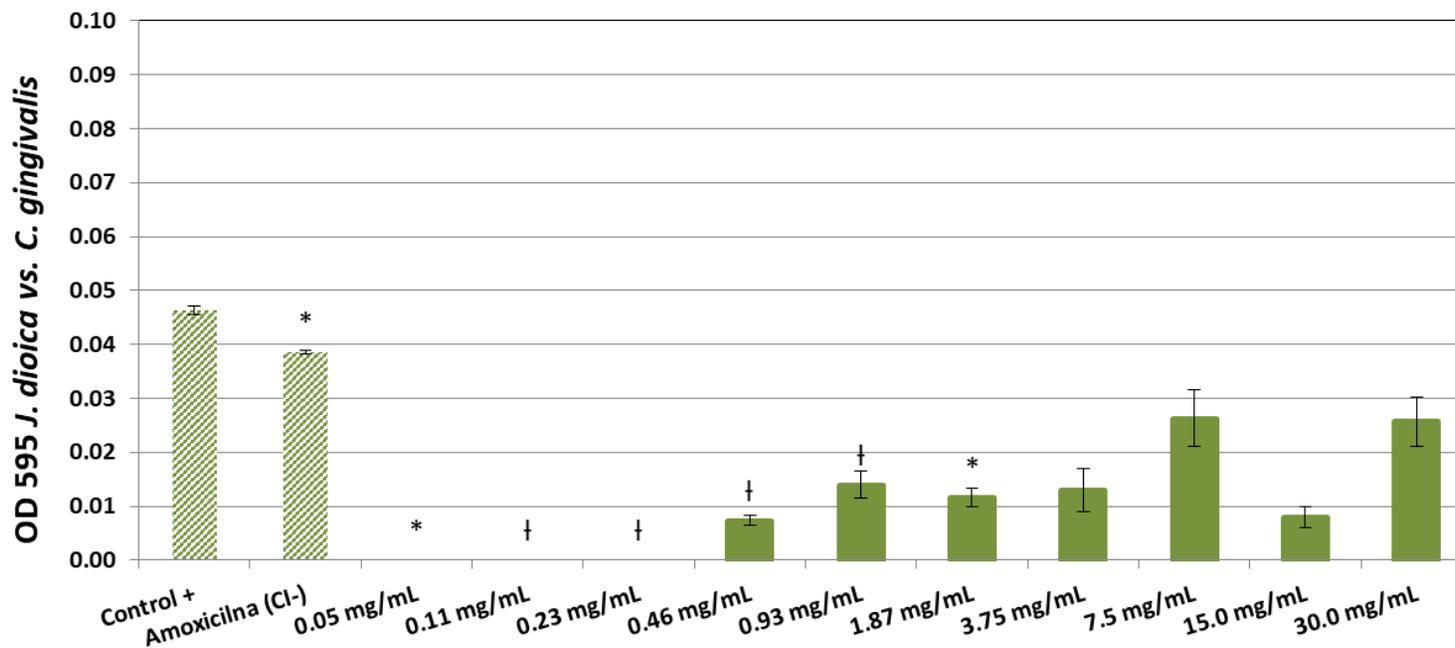


Figura 5. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Capnocytophaga gingivalis*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*)

La susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra una de las especies patógenas putativas representativas del complejo naranja, tuvo efectividad bacteriostática a la mayor concentración evaluada 30.0 mg/ mL (UFC's= 14, $p < 0.05$) con diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla 9. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*.

<i>F. nuc nuc</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.048	0.036	0.003	0.011	0.014	0.005	0.014	0.010	0.006	0.008	0.014	0.010
N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
UFC's	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	14
EEM	0.001	0	0.001	0.003	0.006	0.003	0.005	0.005	0.002	0.001	0.006	0.003
T de Student	-	†	†	*	NS	*	NS	*	†	†	NS	*

F. nuc. nuc.: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC's: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

La media de las OD595 de cada una de las concentraciones probadas contra *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* se presentaron por debajo del control positivo, sin embargo, la única concentración en la cual se pudo realizar el conteo de unidades formadoras de colonia fue 30.0 mg/ mL, por lo tanto, se establece como Concentración Mínima Bacteriostática. Las OD595 se presentan en la tabla 9 y figura 6.

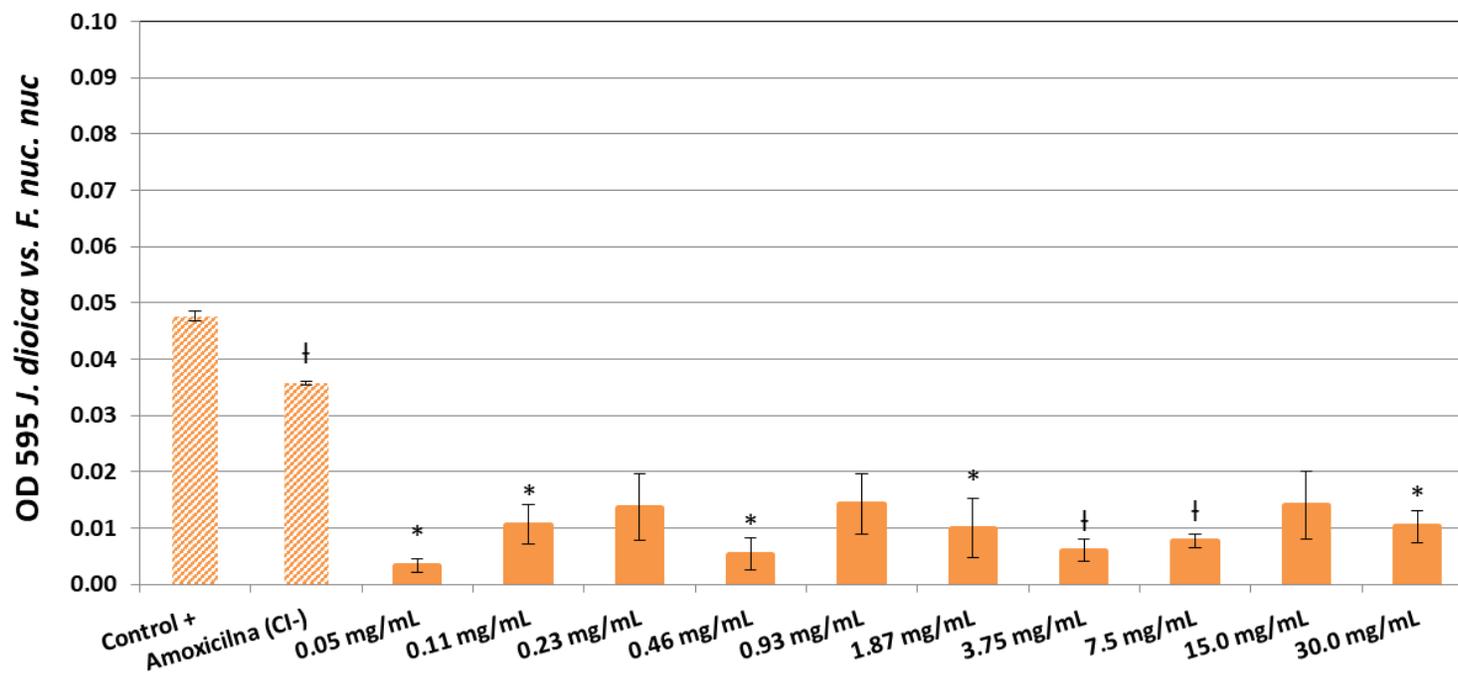


Figura 6. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Fusobacterium nucleatum* subespecie *nucleatum*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*)

Otra de las especies patógenas putativas del complejo naranja que presentó susceptibilidad antibacteriana con el extracto de *J.*

dioica, fue *P. micra*, que presentó reducción en todas las concentraciones evaluadas y con diferencias significativas.

Tabla 10. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Parvimonas micra*.

<i>P. micra</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.067	0.045	0.009	0.007	0.010	0.007	0.008	0.000	0.004	0.010	0.003	0.016
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	844	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	2180	3
EEM	0.002	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.002	0.005	0.002	0.002	0.003	0.001
T de Student	-	*	‡	†	‡	‡	†	*	†	†	†	†

P. micra: *Parvimonas micra*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y $p < 0.001$ (‡).

Corroborando con la viabilidad celular, las UFC's presentaron crecimiento positivo hasta la máxima concentración 30 mg/ mL (UFC's= 3, $p < 0.01$); no obstante, la Concentración Mínima Bacteriostática fue 15 mg/ mL (UFC's= 2180, $p < 0.01$). Para dicha especie, las UFC's del control positivo fueron cuantificables (UFC's: 844) y para el control de inhibición negativa con amoxicilina no se presentó crecimiento positivo. Las OD595 se presentan en la tabla 10 y figura 7.

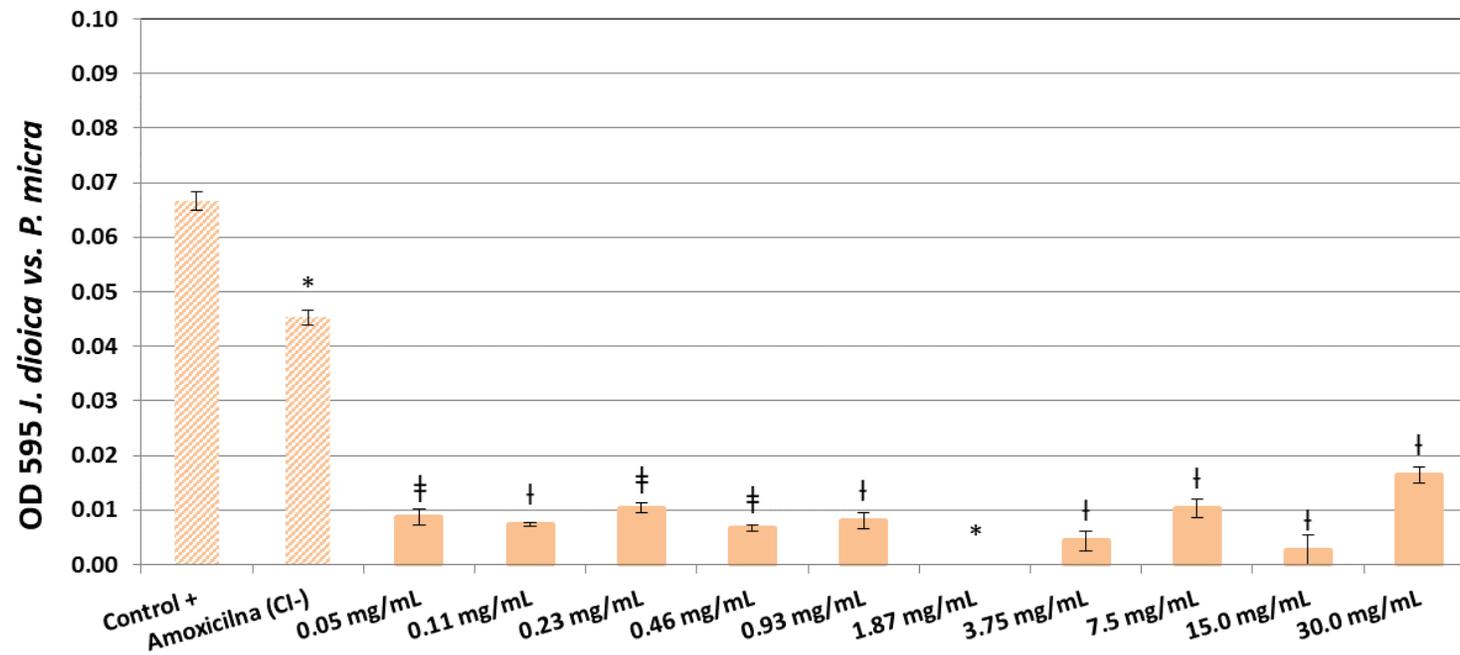


Figura 7 Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Parvimonas micra*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05- 30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*).

La especie *P. endodontalis*, considerada colonizadora tardía, se estudió por presentarse en ciertos tipos de infecciones endo-periodontales. Los resultados obtenidos para dicha especie fueron susceptibilidad antibacteriana a todas las concentraciones evaluadas, considerando la Concentración Mínima Bactericida 0.05 mg/ mL (UFC's: 0, $p < 0.05$). El resto de las concentraciones presentó crecimientos negativos y significancia con OD595 menores en todas las concentraciones (Tabla 11).

Tabla 11. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Porphyromonas endodontalis*.

<i>P. endodontalis</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.072	0.051	0.011	0.012	0.013	0.013	0.014	0.012	0.019	0.024	0.023	0.036
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EEM	0.005	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002	0.003	0.002
T de Student	-	-	*	*	*	*	*	†	†	*	*	NS

P. endodontalis: *Porphyromonas endodontalis*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

La figura 8 muestra la media de cada OD presentando todas valores menores contra el control positivo. Los análisis estadísticos para la presente especie fueron concordantes con el crecimiento negativo bacteriano. El control de inhibición negativo con amoxicilina presentó valores mayores que las concentraciones del extracto evaluadas, sin embargo, con diferencias significativas y valores negativos de crecimiento bacteriano.

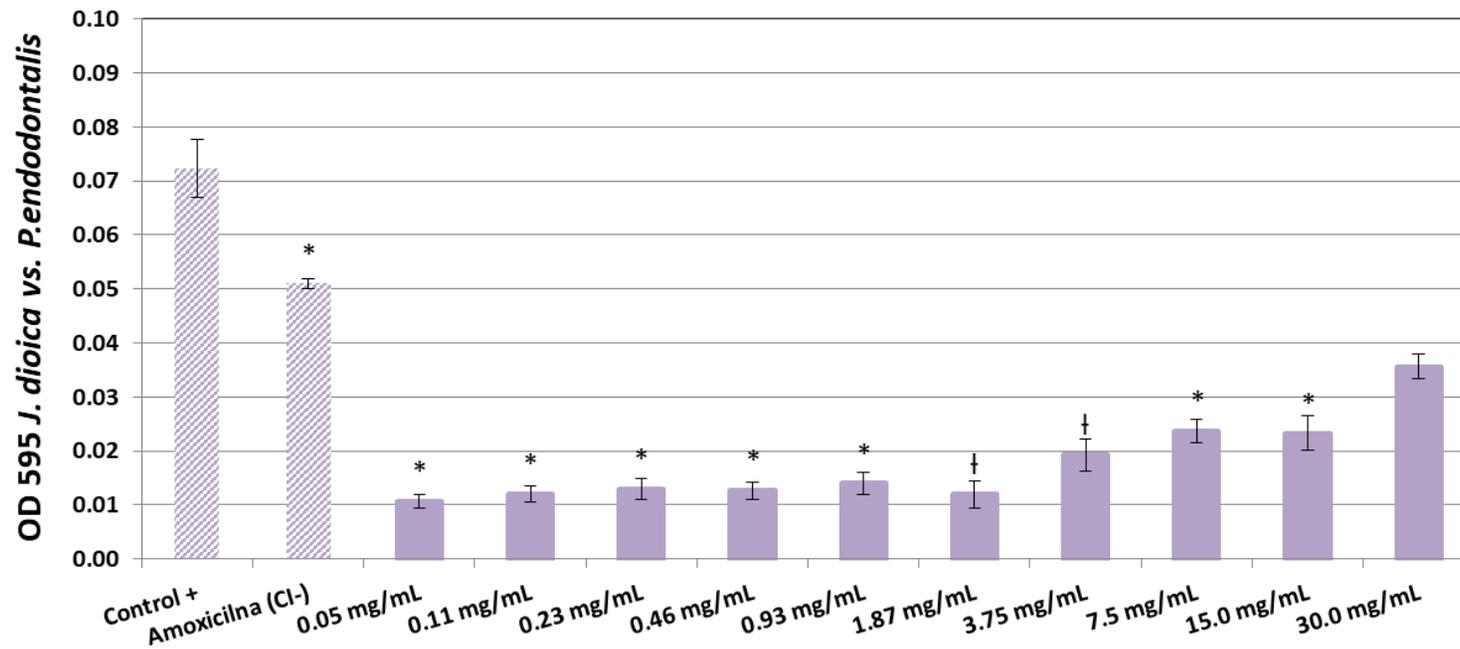


Figura 8. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Porphyromonas endodontalis*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*).

La especie colonizadora tardía *P. gingivalis*, patógena periodontal del complejo rojo de la biopelícula subgingival, fue una de las especies que presentó mayor susceptibilidad antibacteriana al extracto, presentando crecimientos negativos de UFC's (Tabla 12).

Tabla 12. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Porphyromonas gingivalis*.

<i>P. gingivalis</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.044	0.039	0	0	0	0	0.001	0	0.001	0.009	0.011	0.021
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EEM	0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.002	0.007
T de Student	-	*	†	‡	-	‡	‡	‡	†	†	*	NS

P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†), $p < 0.001$ (‡) y NS: No significativo.

Los resultados de la media para las OD595 de los ensayos con *P. gingivalis* (Tabla 12, Figura 9) se observaron por debajo del control positivo, además de que la mayoría presentó disminución estadísticamente significativa. En cuanto a las UFC's, no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las concentraciones probadas (excepto del control positivo), por lo cual se puede sugerir que similar a los ensayos con *P. endodontalis*, la concentración mínima (0.05 mg/ mL, $p < 0.01$) del extracto de *J. dioica* se considera la Concentración Mínima Bactericida contra *P. gingivalis* (Figura 9).

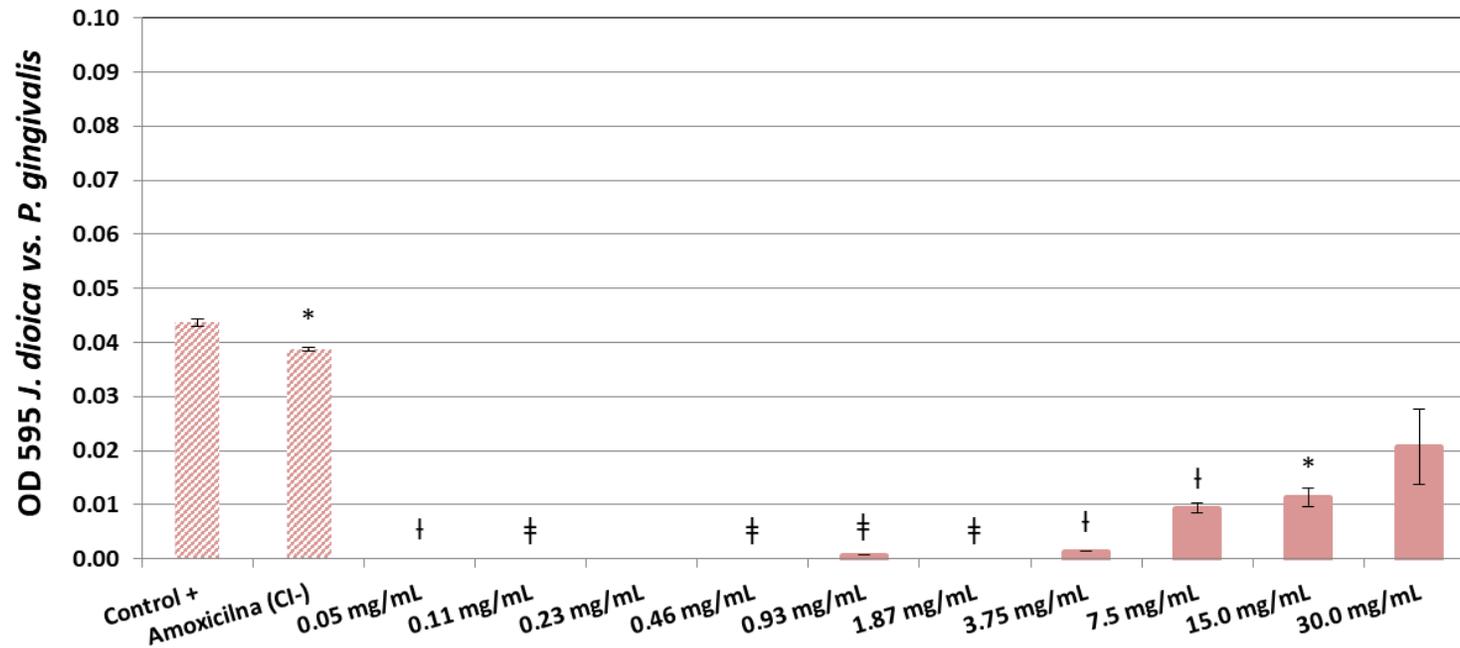


Figura 9. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Porphyromonas gingivalis*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*)

Una de las especies bacterianas que presentó mayor resistencia al extracto de *J. dioica* fue *P. intermedia*, especie colonizadora puente y patógena putativa del complejo naranja. En este caso, los resultados de OD595 no fueron consistentes con el crecimiento bacteriano con las UFC's. Incluso con valores de OD 595 iguales a cero y por debajo del control positivo, la cepa mostró ser resistente a todas las concentraciones del extracto de *J. dioica* puesto que se registró crecimiento bacteriano no contable en las placas de agar.

El control de Inhibición negativa con amoxicilina fue el único que presentó densidad óptica con significancias y crecimientos negativos en la viabilidad celular (UFC's: 0, $p < 0.01$). Las OD595 se presentan en la tabla 13 y figura 10.

Tabla 13. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Prevotella intermedia*.

<i>P. intermedia</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.044	0.036	0.001	0	0	0.022	0	0	0	0.002	0.002	0.018
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
EEM	0	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0	0	0.002
T de Student	-	†	†	‡	†	NS	†	†	‡	‡	*	*

P. intermedia: *Prevotella intermedia*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano no contable. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†), $p < 0.001$ (‡) y NS: No significativo.

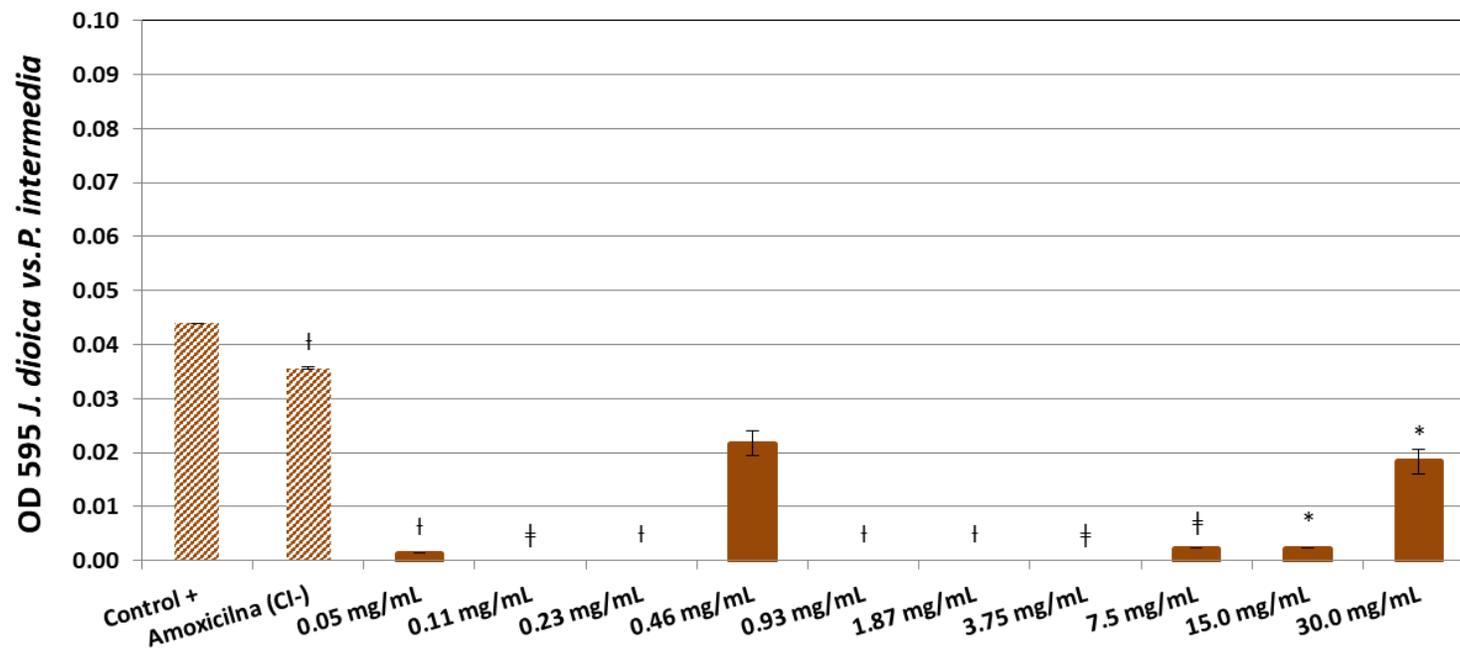


Figura 10. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Prevotella intermedia*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0.05-30.0 mg/mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*)

Similar a los resultados obtenidos en los ensayos con las especies *A. ctinomycetemcomitans* y *C. gingivais*, en las concentraciones máximas del extracto se obtuvieron mejores resultados de susceptibilidad antibacteriana para *S. noxia*, especie colonizadora tardía de la placa subgingival. Los resultados para las concentraciones con disminución en UFC's fueron: 7.0 mg/mL (UFC's= 25, NS), 15.0 mg/mL (UFC's= 69, $p < 0.05$) y 30 mg/ mL (UFC's= 69, NS). La concentración del extracto contra *S. noxia* que se consideró Mínima

Bacteriostática fue 7.0 mg/ mL, presentando el menor número de UFC's= 25. En la concentración máxima se incrementó el número de UFC's: 560, no obstante, corresponde con el valor de su densidad óptica.

Tabla 14. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Selenomonas noxia*.

<i>S. noxia</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.053	0.035	0.002	0.008	0.005	0.005	0.008	0.002	0.015	0.015	0.021	0.043
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	25	69	560
EEM	0.0023	0.0006	0.0003	0.0021	0.0012	0.0021	0.0020	0.0046	0.0039	0.0040	0.0031	0.0049
T de Student	-	*	†	*	*	*	*	*	*	NS	*	NS

S. noxia: *Selenomonas noxia*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; NC: no crecimiento; (+) crecimiento bacteriano. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

El resto de las densidades ópticas que presentaron diferencias significativas en la disminución del extracto demostraron recuperación en la viabilidad por UFC's, excepto para control de inhibición negativa con amoxicilina (UFC's= 0, $p < 0.05$). Las OD595 se presentan en la Tabla 14 y Figura 11.

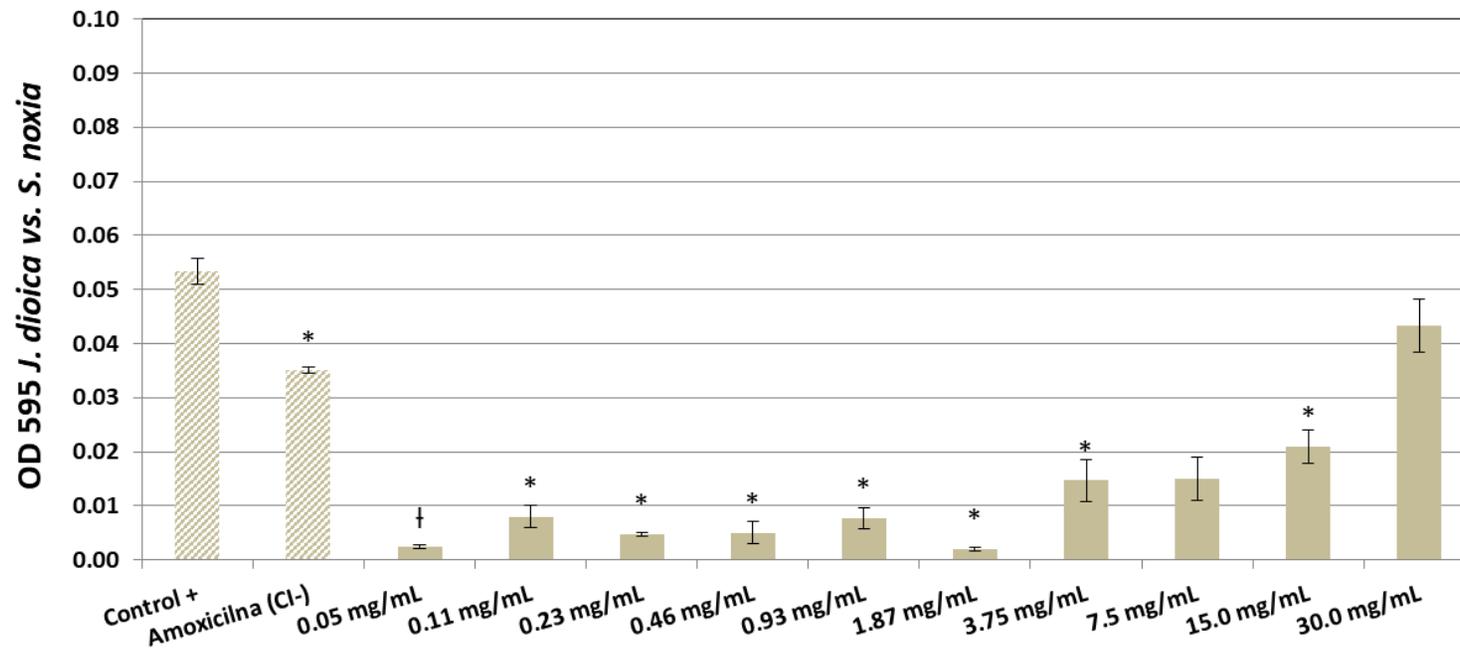


Figura 11. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Selenomonas noxia*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0-05%- 30.0 mg/mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*)

Una de las especies que presentó consistencia en la disminución de las OD595 a concentraciones mayores del extracto de *J. dioica*, con reducción en UFC's fue *S. sanguinis*, considerada especie colonizadora temprana y una de las cepas más resistentes por ser Gram positiva.

Tabla 15. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana de *J. dioica* contra *Streptococcus sanguinis*.

<i>S. sanguinis</i>	Control +	Amoxicilina (CI-)	0.05 mg/mL	0.11 mg/mL	0.23 mg/mL	0.46 mg/mL	0.93 mg/mL	1.87 mg/mL	3.75 mg/mL	7.5 mg/mL	15.0 mg/mL	30.0 mg/mL
Media	0.050	0.036	0	0.004	0.001	0	0	0.009	0.007	0.006	0.004	0.007
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
UFC's	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	341	10
EEM	0.00	0.0009	0.0006	0.0013	0.0017	0.0032	0.0015	0.0054	0.0031	0.002	0.0033	0.0018
T de Student	-	*	†	*	*	*	†	*	NS	NS	NS	*

S. sanguinis: *Streptococcus sanguinis*; Media: Valores de OD595; mg.: miligramos; mL.: mililitros; N: pozos evaluados; UFC: unidades formadoras de colonia (dilución 1:10); EEM: Error Estándar de la Media; (+) crecimiento bacteriano. Las comparaciones fueron realizadas entre el valor del control positivo de la cepa, contra el promedio de cada una de las concentraciones de la especie vegetal incubada con la cepa a las 120 H, y posteriormente se realizó un ajuste de comparaciones múltiples para cada valor de "P" a un IC del 95% con significancias de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (†) y NS: No significativo.

Incluso con valores de OD595 iguales a cero, las únicas placas en las que se pudo realizar el conteo de UFC's fue en aquellas con las concentraciones de 15.0 mg/ mL (UFC's=341_NS) y 30.0 mg/ mL (UFC's=10, $p < 0.05$), por lo tanto, se establece a 15.0 mg/ mL como la Concentración Mínima Bacteriostática contra *S. sanguinis*. Con estos resultados se comprueba el efecto bacteriostático de *J. dioica* sobre dicha cepa. Las OD595 se presentan en la tabla 15 y figura 12.

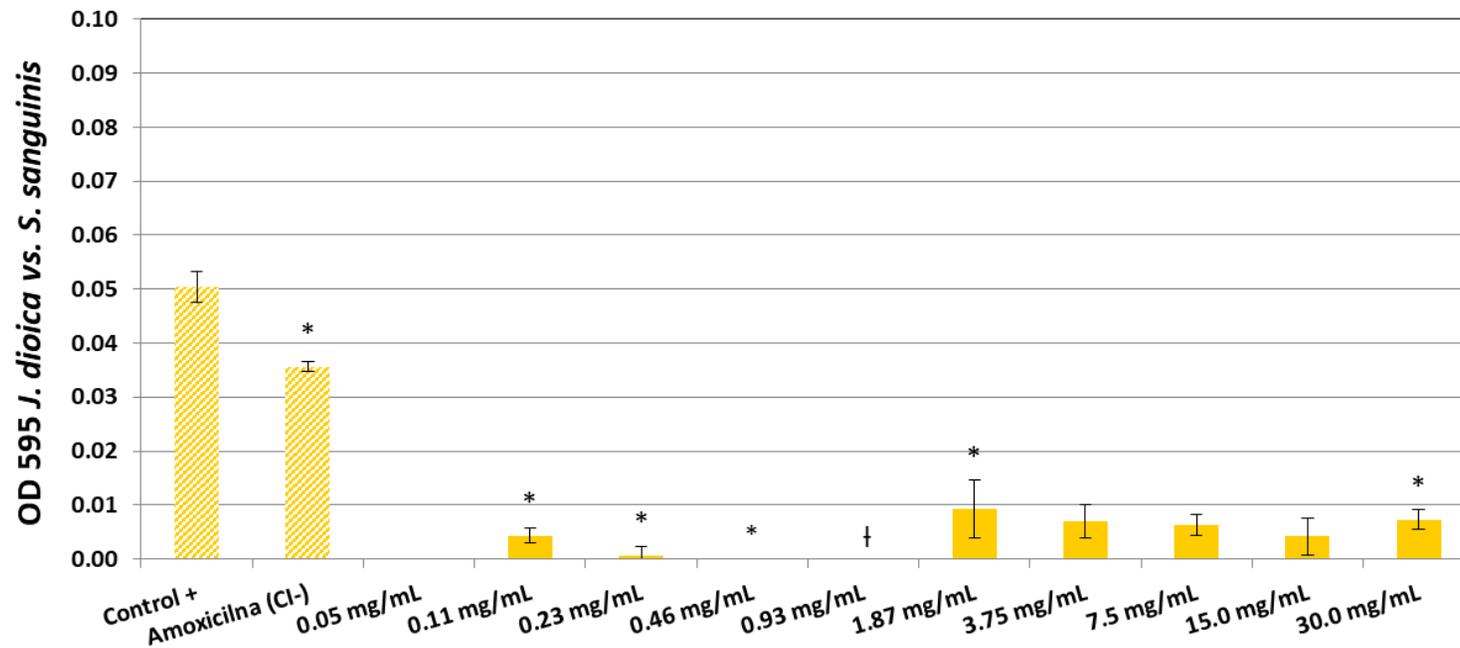


Figura 12. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra *Streptococcus sanguinis*. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de la cepa bajo diez distintas concentraciones (0-05%- 30.0 mg/mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*)

En la Figura 13 se resumen los resultados de los valores de OD595 en la concentración máxima (30.0 mg/ mL) de las todas cepas bacterianas evaluadas. De forma general, todos los valores se encuentran por debajo del control positivo, sin embargo, la forma de verificar los efectos antibacterianos bactericidas y bacteriostáticos fue mediante el crecimiento visible de UFC's. Únicamente la especie de *P. intermedia* mostró ser resistente a la concentración máxima (UFC's: +, $p < 0.05$). Por otro lado, tres de las especies evaluadas

presentaron propiedades Bactericidas ante el extracto: *C. gingivalis*, *P. endodontalis* y *P. gingivalis* (UFC's: 0, NS). El resto de las especies presentó propiedades bacteriostáticas a la máxima concentración evaluada, con mejor efectividad para *P. micra* (UFC's: 3, $p < 0.001$) y *S. sanguinis* (UFC's: 10, $p < 0.05$) (Figura 13).

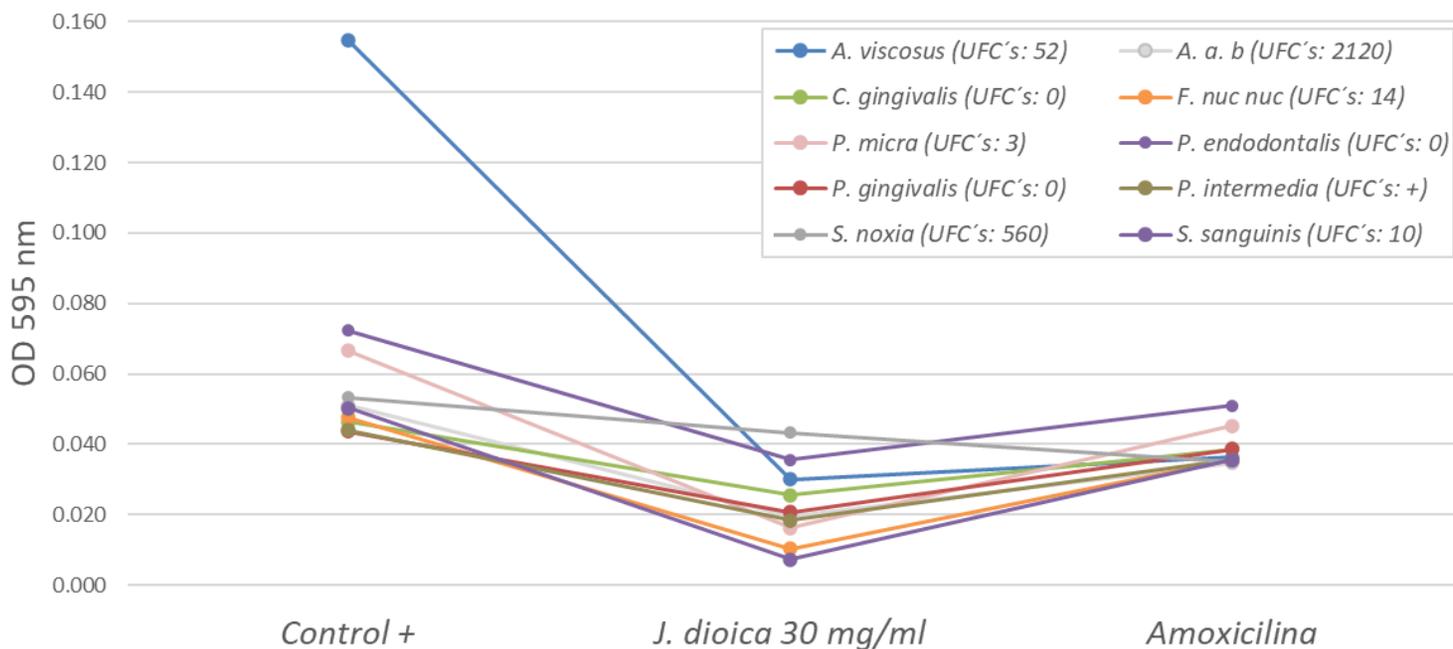


Figura 13. Susceptibilidad antibacteriana del extracto de *J. dioica* contra especies representativas de la placa subgingival. Valores de OD595 en ensayos incubados a 120 H de crecimiento en anaerobiosis; el control de inhibición negativo con Amoxicilina al 0.01%; y el valor de crecimiento de cada cepa en la concentración máxima evaluada (30 mg/ mL) del extracto de *Jatropha dioica* (*J. dioica*).

Las Concentraciones Mínimas Bacteriostáticas para las especies más resistentes de la biopelícula *A. viscosus*, *C. gingivalis* y *S. sanguinis* y ambas Gram positivas, fueron de 15 y 30 mg/ mL respectivamente; el efecto bacteriostático sobre estas especies es un aspecto favorable pues son colonizadores primarios que ayudan a mantener el equilibrio de la microbiota. Mientras que para periodonto-patógenos putativos como *S. noxia*, *A. actinomycetemcomitans* stp. *b*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. micra*, y *C. gingivalis*, la inhibición del crecimiento para algunas de ellas se demostró en concentraciones desde 3.75, 7.0, 15.0 y/o 30.0 mg/ mL, lo cual prueba los efectos bacteriostáticos de *J. dioica* en concentraciones intermedias.

Las especies más susceptibles al extracto fueron *P. endodontalis* y *P. gingivalis* debido a que no hubo crecimiento visible en ningunas de las concentraciones evaluadas, lo cual prueba el efecto bactericida sobre dichos patógenos periodontales, por demás, la mayoría de los resultados OD595 se clasificaron como estadísticamente significativos.

Finalmente *P. intermedia* fue la única cepa que exhibió crecimiento bacteriano no contable en todas las concentraciones, a pesar de que todos los resultados fueron estadísticamente significativos y con algunos valores de OD595 iguales a cero; concluyendo de esta forma como la cepa con mayor resistente al extracto de la especie vegetativa *J. dioica*.

9. DISCUSIÓN

Las enfermedades periodontales continúan siendo un cometido de la salud pública tanto en México como a nivel mundial. El principal factor etiológico de estas patologías es la respuesta inmune del hospedero debido a la disbiosis de la biopelícula subgingival (2, 3, 5, 36, 61). Actualmente se reconocen más especies en la cavidad bucal que forman parte de su ecosistema y que también podrían estar relacionadas con los estados de enfermedad; no obstante, Socransky y cols. marcaron un punto importante en la odontología al analizar más de 13, 000 muestras de la placa dentobacteriana subgingival y de esta forma, agruparon a las bacterias que se relacionan con los estados de enfermedad de aquellas que son compatibles con la salud periodontal (4, 5, 30, 32).

Las diez especies bacterianas seleccionadas para la presente estudio, se clasifican dentro de un grupo diferente ya sea como colonizador primario (o compatibles con salud periodontal), colonizadores puente (o patógenos putativos) y colonizadores tardíos (o periodonto-patógenos reconocidos) (4, 5).

El extracto de *J. dioica* demostró tener propiedades bactericidas a la concentración mínima evaluada (0.05 mg/ mL) contra las especies patógenas periodontales como: *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, esta última, involucrada en infecciones endoperiodontales (62); adicionalmente, presentó propiedades bacteriostáticas contra especies involucradas en la periodontitis como son: *S. noxia* y *A. actinomycetemcomitans* stp. b; por lo que se considera efectividad antibacteriana del extracto, contra especies que se asocian con las enfermedades periodontales. Adicionalmente, la efectividad bacteriostática contra especies colonizadoras puente o patógenas putativas como: *P. micra* y *F. nucleatum* subsp.

nucleatum, quienes participan en el proceso de coagregación en la maduración de la biopelícula (4, 5, 63, 64). Por otro lado, el extracto evaluado contra una de las especies que también cumple la función de coagregación, como es *P. intermedia*, no tuvo efectos antibacterianos en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por otro lado, especies colonizadoras primarias como son *A. viscosus* y *S. sanguinis* presentaron propiedades bacteriostáticas hasta las máximas concentraciones evaluadas (15 y 30 mg/ mL) con lo cual se sugiere que especies que logran el equilibrio ecológico de la biopelícula subgingival presentan mayor resistencia al extracto (4, 5).

La literatura reporta escasos estudios que hayan evaluado las propiedades antimicrobianas de *J. dioica*. Terrazas Hernández y cols. (17) estudiaron si el proceso de esterilización en autoclave repercutía sobre las propiedades del extracto de *J. dioica*, incluyendo sus efectos antimicrobianos contra *S. mutans*. Su ensayo consistió en medir mediante espectrofotometría (OD 600 nm), por intervalos de 4 h durante 80 h, la curva de crecimiento de *S. mutans* a una concentración de 10^3 CFU/ mL bajo los efectos del extracto (5 mg/ mL); reportando que la cepa en conjunto con el extracto mantenía un comportamiento similar al control negativo (de Clorhexidina). Además, determinaron la concentración mínima inhibitoria para dicha especie de 2 mg/ mL. Contradictorio al presente estudio, la cepa de *Streptococcus* evaluada, presentó susceptibilidad hasta a 15.0 mg/ mL. Cabe mencionar que los ensayos del presente estudio evaluaron concentraciones bacterianas de 10^8 células, lo cual representa mayor cantidad celular que en los ensayos de Terrazas y cols (17).

Asimismo, otro estudio reportó las propiedades antibacterianas del extracto acuoso (90°C) y de etanol de *J. dioica* contra *S. mutans* (10^8 células/ mL) con el método de difusión en agar. A pesar de que ambos extractos presentaron valores similares del radio de inhibición (2.00 ± 0.06 mm y 2.05 ± 0.06 respectivamente); los autores decidieron examinar únicamente el extracto acuoso (90°C) mediante otro ensayo (dilución en agar) debido a la mayor cantidad de componentes que este demostró durante su análisis cualitativo. Con el método de dilución en agar se probaron 6 concentraciones diferentes (62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ppm) estableciendo como concentración máxima media inhibitoria (IC₅₀) a 250 ppm (18), considerando que aproximadamente 0.001 mg/ mL (1 mg/ L) es equivalente a 1 ppm, la concentración del extracto presentó efectividad a 0.25 mg/ mL, concentración con efectividad similar a la efectividad bactericida presentada en el presente estudio, sobre las especies patógenas de *Porphyromonas*.

Silva Belmares y cols. evaluaron las propiedades antimicrobianas, mediante difusión en agar, de extractos de *J. dioica* con distintos solventes (hexano, acetona y metanol) a una concentración de 500 µg. Entre las especies probadas destacan: *S. aureus* (10^6 CFU/ mL) y *C. albicans* ($0.5 - 2.5 \times 10^3$ células/ mL) (16). Los efectos antimicrobianos fueron positivos, teniendo mejores resultados con el extracto de hexano sobre *S. aureus* (16 ± 1 mm) y con el de metanol, para *C. albicans* (14 ± 2 mm). En el presente estudio, no fue evaluado el extracto con difusión en agar, sin embargo, se sugiere la técnica para una evaluación adicional del extracto a las concentraciones evaluadas en el presente estudio.

A pesar de que la inhibición para la mayoría de las cepas evaluadas en la presente investigación fue bacteriostática y a concentraciones intermedias y máximas del extracto,

en comparación con los otros autores, se enfatiza que la cantidad de cepa bacteriana utilizada para los ensayos microbiológicos fue mayor (10^8 células/ mL) que la evaluada en otros reportes antimicrobianos de la especie vegetal (10^6 y 10^3 CFU/ mL) (16, 17), además de la diversidad en cuanto a resistencia bacteriana de las cepas evaluadas en el presente estudio.

Los investigadores quienes proporcionaron el extracto para el presente estudio, caracterizaron previamente sus componentes mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (17). Logrando así identificar ácidos fenólicos como ácido vanílico y ácido cafeico al igual que los siguientes flavonoides: naringenina, apigenina y galangina. Existen reportes que han confirmado las propiedades antimicrobianas de esos componentes, de manera individual, contra especies como *S. aureus* y *S. mutans* (65-69), sin embargo, la sinergia de todos los componentes puede ser la responsable de las propiedades microbicidas del extracto completo (17).

Vargas Segura y cols. (18) también analizaron mediante HPLC los componentes de un extracto acuoso (90°C) de *J. dioica*, encontrando cuatro compuestos específicos, cada uno de ellos pertenecientes a un grupo químico: tirosoles, flavonoides o ácidos polifenólicos. Asimismo, otros reportes han estudiado los efectos antibacterianos de dichos compuestos; no obstante, se han realizado con especies que no forman parte de la biopelícula subgingival tales como *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* y *Acinetobacter baumannii* (70-72).

Silva Belmares y cols. identificaron un compuesto activo a partir de un extracto hexánico de *J. dioica*: 3beta-stigmast-5-in-3-ol (β -sitosterol). Este compuesto solo demostró ser activo contra *E. coli*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *S. aureus* (16).

Martínez Nelvy y cols. compararon (15), mediante un análisis fitoquímico cualitativo, los metabolitos de 3 extractos preparados con diferentes solventes y de una decocción de *J. dioica*. Se encontraron diferencias entre los componentes de cada extracto y la decocción; no obstante, todos los solventes compartían la presencia de flavonoides.

El tipo de solvente y el proceso de extracción no son los únicos factores que afectan cualitativa y/o cuantitativamente en los componentes del extracto. También repercuten los factores bióticos y abióticos, es decir; la temporada y el lugar de recolección de la planta. (14-18). Los rizomas utilizados para el extracto evaluado en el presente estudio fueron recolectados durante la temporada de sequía en la región de Morelos, Zacatecas; está demostrado que dichas condiciones aumentan la cantidad total de fenoles, probablemente porque las raíces son las primeras en detectar la disminución en el suministro de agua induciendo una respuesta de estrés biológico la cual libera metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos. Otro factor que aumentó el contenido de compuestos bioactivos fue la liofilización de los rizomas en lugar de secarlos como lo han realizado otros investigadores. Adicionalmente el proceso de esterilización en autoclave favoreció el incremento en el contenido total de fenoles y flavonoides (14, 17).

Otra de las propiedades por las cuales es de interés la especie *J. dioica*, además de sus propiedades antimicrobianas, son la citotoxicidad y genotoxicidad que la especie vegetal no presenta de forma significativa (15, 16). Adicional a su efecto antioxidante incluso en

concentraciones muy bajas, debido a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (14, 15, 17, 19). Con lo que, sumado a los resultados del presente estudio, las propiedades antibacterianas pueden deberse a dichas propiedades antioxidantes.

A pesar de las diferencias en la metodología de los estudios reportado *in-vitro* sobre las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de *J. dioica*, la mayoría reportan consistencia con los resultados antimicrobianos similares a los reportados en la presente investigación (14, 15, 17-20). Esto podría ser un punto clave por el cual la planta se sigue utilizando en la medicina tradicional para tratar la movilidad dental (50). Los signos y síntomas de las periodontitis son el resultado clínico de la compleja respuesta inmune del hospedero ante la disbiosis de la biopelícula (3-5, 38). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel fundamental en dirigir las células del sistema inmune, acelerando la activación de los osteoclastos quienes inician la resorción ósea (73). Por lo que, el extracto de *J. dioica* podría ser un coadyuvante potencial para tratar las enfermedades periodontales puesto que, si tiene la misma efectividad *in-vivo* como se ha probado de forma *in-vitro* (14-17, 19, 20), tendría efectos antimicrobianos que también regularían la respuesta inmune al contrarrestar los efectos de las ROS gracias a sus propiedades antioxidantes. Entre otros muchos beneficios, podría satisfacer las necesidades de sus actuales consumidores, como lo han logrado algunas empresas al comercializar productos para la higiene bucal con extractos naturales; por ejemplo, los aceites esenciales (eucaliptol, mentol, salicilato de metilo y timol), una línea de dentífricos con extractos naturales a partir especies vegetales como *Eucalyptus globulus*, *Citrus limón* (limón), *Citrus aurantifolia* (lima), *Aloe bardensis* (aloe vera), *Curcuma longa* (cúrcuma) y

Mentha spicata (hierbabuena) (<https://rb.gy/hebstk>). Existe evidencia científica, ya sea en ensayos clínicos o *in-vitro*, que justifica añadir aceites esenciales así como los extractos de las especies mencionadas como parte de los ingredientes en los productos de higiene bucal (27, 47, 49, 52, 53, 74-78).

Finalmente, es importante mencionar que la aplicación de productos naturales presenta menor probabilidad de causar efectos secundarios (75, 79-81). Se ha demostrado que el empleo de la clorhexidina aumenta el éxito de la fase I periodontal, principalmente cuando ésta se realiza en una sola cita, debido a que disminuye los niveles de placa dentobacteriana, así como la profundidad de las bolsas periodontales en comparación con grupos que solo reciben la terapia mecánica sin el uso concomitante de antisépticos. Sin embargo, la aplicación de clorhexidina debe ser moderada a causa de sus efectos secundarios como disgeusia o pigmentación del esmalte (9, 82). Otras de las sustancias comúnmente empleadas para tratar las infecciones periodontales son los antibióticos, no obstante, su prescripción continúa siendo controversial, limitándose a casos como periodontitis severa, para después de la fase quirúrgica o no quirúrgica en pacientes con antecedentes de supuración y/o para prevenir la diseminación bacteriana en pacientes con riesgos sistémicos. Asimismo la prescripción de antibióticos debe ser una decisión sensata debido a que no son selectivos para especies de la flora periodontal además de que se encuentra ampliamente demostrado que el abuso de antibióticos puede generar disbiosis en la microbiota y genes de resistencia por lo que el uso de productos naturales se ha vuelto de mayor interés para la ciencia actual, además de los bajos costos que implica para comunidades de bajos recursos (10, 47, 75, 79, 83-85).

10. CONCLUSIONES

Se establecieron las concentraciones mínimas inhibitorias, así como la susceptibilidad de cada cepa, sugiriendo así la selectividad de *J. dioica*, quien posee propiedades antimicrobianas bacteriostáticas contra *A. viscosus*, *A. actinomycetemcomitans* stp. b., *C. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *P. micra*, *S. noxia* y *S. sanguinis*; y con propiedades bactericidas contra *C. gingivalis*, *P. endodontalis* y *P. gingivalis*. La única especie bacteriana con la cual el extracto probó ser resistente, fue *P. intermedia*.

La especie vegetal *J. dioica*, posee propiedades bacteriostáticas y bactericidas para especies patógenas periodontales de la placa subgingival, lo cual infiere la selectividad antibacteriana *in-vitro* del extracto, sugiriendo que puede ser un coadyuvante para el control de la placa dental en el tratamiento de las enfermedades periodontales.

Los resultados del presente estudio justifican posteriores investigaciones para evaluar el comportamiento del extracto de *J. dioica* ya sea en modelos de biopelícula o en ensayos clínicos, en relación con las propiedades antioxidantes, de citotoxicidad y antibacterianas previamente corroboradas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-53.
2. Salud Sd. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales SIVEPAB 2019. In: Salud SdPyPdl, editor.: Dirección General de Epidemiología; 2020. p. 70.
3. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89 Suppl 1:S173-S82.
4. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
5. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005;38(1):135-87.
6. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(11):965-74.
7. Cruz G, Picazzo E. The paradigm of oral health in Mexico. *Journal of Oral Research*. 2017;6(1):8-9.
8. Cruz Martinez C, Diaz Gomez M, Oh MS. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharmaceutical biology*. 2017;55(1):1992-8.
9. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017;3:CD008676.
10. Lindhe J, Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz SA. *Periodontología clínica e implantología odontológica: 6a edición*: Editorial Médica Panamericana; 2017.
11. Soria-Rangel JL, Chino-Vargas S. *Etnobotánica de "sangreado" (Jatropha dioica Sessé ex Cerv) en la región chichimeca de San Luis de la Paz, Guanajuato*. . DGB UNAM: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; 2017.
12. Laccourreye O, Werner A, Laccourreye L, Bonfils P. Benefits, pitfalls and risks of phytotherapy in clinical practice in otorhinolaryngology. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*. 2017;134(2):95-9.
13. Lopes CMC, Lazzarini JR, Soares Junior JM, Baracat EC. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2018;64(9):765-8.

14. Gutiérrez-Tlahque J, Leobardo C, Raya-Pérez J, Ramírez-Pimentel J, Jiménez-Alvarado R, Hernández-Fuentes A. Effect of climate conditions on total phenolic content and antioxidant activity of *Jatropha dioica* Cerv. var. *dioica*. *Ciencia e investigación agraria*. 2018;45(1):70-81.
15. Martínez N, Almaguer G, Vázquez-Alvarado P, Figueroa A, Zúñiga C, Hernández-Ceruelos A. Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida, daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2014;13(5):437-57.
16. Silva-Belmares Y, Rivas-Morales C, Viveros-Valdez E, de la Cruz-Galicia MG, Carranza-Rosales P. Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. 2014;17(5):748-50.
17. Terrazas-Hernández J, Santos-López E, Cariño-Cortés R, Jiménez-Alvarado R, López-Palestina C, Hernández-Fuentes A. Effects of Sterilization on Bioactives of *Jatropha dioica* and *Opuntia oligacantha* Extracts, and on Antimicrobial Capacity against *Streptococcus mutans*. *Applied Sciences*. 2018;8(12):2516.
18. Vargas-Segura AI, Silva-Belmares SY, Segura-Ceniceros EP, Ascacio-Valdes JA, Mendez-Gonzalez L, Ilyina A. Screening and characterization of medicinal plants extracts with bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. *Natural product research*. 2020;34(18):2672-6.
19. Wong-Paz JE, Castillo-Inungaray ML, López-López LI, Contreras-Esquivel JC, Nevárez-Moorillon GV, Aguilar CN. *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2010;2(4).
20. Wong-Paz JE, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Carrillo-Inungaray ML, López LI, Nevárez-Moorillón GV, et al. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2015;8(2):104-11.
21. Beighton D. Can the ecology of the dental biofilm be beneficially altered? *Advances in dental research*. 2009;21(1):69-73.
22. Flores AA, Olea JGV. *Ecología oral: Manual Moderno*; 2017.
23. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006;94(1):1-9.

24. Palmer J, Flint S, Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2007;34(9):577-88.
25. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-93.
26. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *Journal of periodontology*. 2008;79(9):1620-9.
27. Auschill T, Artweiler N, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Archives of Oral Biology*. 2001;46(5):471-6.
28. Keijser B, Zaura E, Huse S, Van der Vossen J, Schuren F, Montijn R, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of dental research*. 2008;87(11):1016-20.
29. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontology 2000*. 2009;51:38-44.
30. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *Journal of clinical periodontology*. 2011;38 Suppl 11:7-16.
31. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*. 2010;5(2):e9321.
32. Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *mSystems*. 2018;3(6):e00187-18.
33. Xiao C, Ran S, Huang Z, Liang J. Bacterial Diversity and Community Structure of Supragingival Plaques in Adults with Dental Health or Caries Revealed by 16S Pyrosequencing. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1145.
34. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME journal*. 2012;6(6):1176-85.
35. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(12):869-77.
36. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*. 2014;35(1):3-11.
37. Casillas APV, Ocampo BRY, Arrieta CAM. *Periodontología e implantología: Panamericana*; 2016.

38. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(7):481-90.
39. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *Journal of periodontology*. 2018;89:S9-S16.
40. Segura Andrés G, Gil Pulido R, Vicente González F, Ferreira Navarro A, Faus López J, Agustín Panadero R. Periimplantitis y mucositis periimplantaria: factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2015;27:25-36.
41. Parameter on Plaque-Induced Gingivitis. *Journal of periodontology*. 2000;71(5S):851-2.
42. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89 Suppl 1:S17-S27.
43. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45:S68-S77.
44. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45:S44-S67.
45. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45 Suppl 20:S1-S8.
46. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*. 2018;89 Suppl 1:S159-S172.
47. Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Brazilian Oral Research*. 2009;23:39-48.
48. Colombo AP, Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *Journal of periodontology*. 2012;83(10):1279-87.
49. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales: Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances en periodoncia e implantología oral*. 2006;18(1):21-9.

50. Waizel-Bucay J, Martínez-Rico IM. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista aDM*. 2011;58(2):73-88.
51. Ajmera N, Chatterjee A, Goyal V. Aloe vera: It's effect on gingivitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013;17(4):435-8.
52. Karim B, Bhaskar DJ, Agali C, Gupta D, Gupta RK, Jain A, et al. Effect of Aloe vera mouthwash on periodontal health: triple blind randomized control trial. *Journal of clinical periodontology*. 2011;13:14-9.
53. Vangipuram S, Jha A, Bhashyam M. Comparative efficacy of aloe vera mouthwash and chlorhexidine on periodontal health: A randomized controlled trial. *Journal of clinical and experimental dentistry*. 2016;8(4):e442-e7.
54. Rosas-Pinon Y, Mejia A, Diaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sanchez-Nieto S, Rivero-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(3):860-5.
55. Babu NV, Vivek D, Ambika G. Comparative evaluation of chlorhexidine mouthrinse versus cacao bean husk extract mouthrinse as antimicrobial agents in children. *European Archives of Paediatric Dentistry*. 2011;12(5):245-9.
56. Salinas-Peña EA, Mendoza-Rodríguez M, Rodríguez-Hernández AP. Evaluación Antimicrobiana in-vitro de los extractos *Amelanchier denticulata* frente a microorganismos asociados con Periodontitis: Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo; 2019.
57. Manzanero-Medina GI, Flores-Martínez A, Sandoval-Zapotitla E, Bye-Boettler R. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el Mercado de Sonora de la ciudad de México. *Polibotánica*. 2009(27):191-228.
58. Araujo-Espino DI, Zamora-Perez AL, Zuniga-Gonzalez GM, Gutierrez-Hernandez R, Morales-Velazquez G, Lazalde-Ramos BP. Genotoxic and cytotoxic evaluation of *Jatropha dioica* Sesse ex Cerv. by the micronucleus test in mouse peripheral blood. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP. 2017;86:260-4.
59. Conabio, Semarnat. Cuarto informe nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB). Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales México DF. 2009.
60. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(suppl_1):5-16.

61. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *TheScientificWorldJournal*. 2020;2020:2146160.
62. Mirucki CS, Abedi M, Jiang J, Zhu Q, Wang YH, Safavi KE, et al. Biologic activity of porphyromonas endodontalis complex lipids. *Journal of endodontics*. 2014;40(9):1342-8.
63. Horiuchi A, Kokubu E, Warita T, Ishihara K. Synergistic biofilm formation by Parvimonas micra and Fusobacterium nucleatum. *Anaerobe*. 2020;62:102100.
64. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(7):471-80.
65. Cushnie TP, Hamilton VE, Chapman DG, Taylor PW, Lamb AJ. Aggregation of Staphylococcus aureus following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of applied microbiology*. 2007;103(5):1562-7.
66. Pinho E, Soares G, Henriques M. Evaluation of antibacterial activity of caffeic acid encapsulated by beta-cyclodextrins. *Journal of microencapsulation*. 2015;32(8):804-10.
67. Qian W, Yang M, Wang T, Sun Z, Liu M, Zhang J, et al. Antibacterial Mechanism of Vanillic Acid on Physiological, Morphological, and Biofilm Properties of Carbapenem-Resistant Enterobacter hormaechei. *Journal of food protection*. 2020;83(4):576-83.
68. Wang M, Firman J, Liu L, Yam K. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota. *BioMed research international*. 2019;2019:7010467.
69. Yue J, Yang H, Liu S, Song F, Guo J, Huang C. Influence of naringenin on the biofilm formation of Streptococcus mutans. *Journal of dentistry*. 2018;76:24-31.
70. Bisignano C, Filocamo A, Ginestra G, Giofre SV, Navarra M, Romeo R, et al. 3, 4-DHPEA-EA from Olea Europaea L. is effective against standard and clinical isolates of Staphylococcus sp. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2014;13(1):1-4.
71. Ibitoye OB, Ajiboye TO. Ferulic acid potentiates the antibacterial activity of quinolone-based antibiotics against Acinetobacter baumannii. *Microbial pathogenesis*. 2019;126:393-8.
72. Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of applied microbiology*. 2010;109(2):515-27.

73. Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, et al. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontology* 2000. 2020;84(1):45-68.
74. Chatterjee A, Debnath K, Rao NKH. A comparative evaluation of the efficacy of curcumin and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A double-blinded randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2017;21(2):132-7.
75. Li Y, Jiao J, Qi Y, Yu W, Yang S, Zhang J, et al. Curcumin: A review of experimental studies and mechanisms related to periodontitis treatment. *Journal of periodontal research*. 2021;56(5):837-47.
76. Liu Y, Liu P, Wang L, Shi Y, Chen J, Wang H, et al. Inhibitory effects of citrus lemon oil and limonene on *Streptococcus sobrinus* - Induced dental caries in rats. *Arch Oral Biol*. 2020;118:104851.
77. Patri G, Sahu A. Role of Herbal Agents - Tea Tree Oil and Aloe vera as Cavity Disinfectant Adjuncts in Minimally Invasive Dentistry-An In vivo Comparative Study. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2017;11(7):DC05-DC9.
78. Serbiak B, Foure T, Geonnotti AR, Gambogi RJ. In vitro efficacy of essential oil mouthrinse versus dentifrices. *Journal of dentistry*. 2018;69:49-54.
79. Chandra Shekar BR, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacognosy reviews*. 2015;9(18):87-92.
80. Furquim Dos Santos Cardoso V, Amaral Roppa RH, Antunes C, Silva Moraes AN, Santi L, Konrath EL. Efficacy of medicinal plant extracts as dental and periodontal antibiofilm agents: A systematic review of randomized clinical trials. *Journal of ethnopharmacology*. 2021;281:114541.
81. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1529.
82. Oh TJ. Adjunctive Use of Chlorhexidine Mouthwash to Nonsurgical Periodontal Therapy May Enhance Periodontal Pocket Depth Reduction. *The journal of evidence-based dental practice*. 2018;18(4):358-9.

83. Almeida VSM, Azevedo J, Leal HF, Queiroz ATL, da Silva Filho HP, Reis JN. Bacterial diversity and prevalence of antibiotic resistance genes in the oral microbiome. *PloS one*. 2020;15(9):e0239664.
84. Kapoor A, Malhotra R, Grover V, Grover D. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dental research journal*. 2012;9(5):505.
85. Shaw LP, Bassam H, Barnes CP, Walker AS, Klein N, Balloux F. Modelling microbiome recovery after antibiotics using a stability landscape framework. *The ISME journal*. 2019;13(7):1845-56.