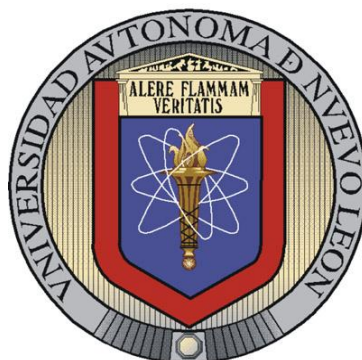


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE QUITOSAN Y PULULANO
ADICIONADAS CON EXTRACTOS DE CINCO DIFERENTES PLANTAS Y
SU EVALUACIÓN EN CULTIVOS DE MICROORGANISMOS
PERIODONTOPATÓGENOS

Por

M. C. AÍDA RODRÍGUEZ GARCÍA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en BIOTECNOLOGÍA

Marzo del 2011

APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS

ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE QUITOSAN Y PULULANO
ADICIONADAS CON EXTRACTOS DE CINCO DIFERENTES PLANTAS Y SU
EVALUACIÓN EN CULTIVOS DE MICROORGANISMOS
PERIODONTOPATÓGENOS

Comité de Tesis

Dr. Luis J. Galán Wong
Director de Tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Co-Directora

Dra. Ma. Julia Verde Star
Vocal

Dra. Ma. del Socorro Flores González
Vocal

Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal

APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ ACADÉMICO

ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE QUITOSAN Y PULULANO
ADICIONADAS CON EXTRACTOS DE CINCO DIFERENTES PLANTAS Y SU
EVALUACIÓN EN CULTIVOS DE MICROORGANISMOS
PERIODONTOPATÓGENOS

Comité de Doctorado

Subdirector de Estudios de Posgrado

Sin sueños, las pérdidas se vuelven insostenibles,
Las piedras del camino se tornan montañas,
Los fracasos se transforman en golpes fatales.
Más, si tenemos grandes sueños...
Los errores producirán crecimiento,
Los desafíos producirán coraje.

Augusto Cury

DEDICATORIA

A MI ESPOSO

por su apoyo y comprensión al permitirme seguir
en el camino de la superación profesional.

A MIS HIJOS:

ADRIÁN Y ROCÍO, ALE Y SERGIO Y MAURI

por su comprensión a mis ausencias,
por ser partícipes directos de mis logros,
de mis angustias, de mis ratos felices.

Los quiero mucho y estoy muy orgullosa de ustedes.

Lo dedico a ustedes,

Con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme el gran regalo de existir, por la salud, por llenarme de bendiciones y felicidad y por llenar mi vida de personas especiales.

Al Dr. Luis J. Galán, por su confianza al darme la oportunidad de realizar este proyecto tan importante en mi vida profesional, en el Instituto de Biotecnología a su cargo y por su contribución a mi formación. Por brindarme su sincera amistad, Gracias.

A la Dra. Katihuska Arévalo, quiero expresar mi más profunda gratitud por asesorarme guiarme y apoyarme durante todo el proyecto y por ser una persona de gran inteligencia y profesionalismo a quien admiro y aprecio. Estoy y estaré a su disposición en cualquier ámbito, en cualquier tiempo. Muchas Gracias!

A la Dra. Julia Verde, por sus sugerencias, su disposición, su amabilidad y por su valiosa colaboración en el presente trabajo.

A la Dra. Socorro Flores, por su orientación, asesoría y amistad. Por ser ejemplo de dedicación, trabajo y seriedad. Admiro enormemente su naturaleza estudiosa y su auténtica vocación científica.

Al Dr. Benito Pereyra por apoyarme y orientarme. Por el análisis y revisión de este trabajo. Gracias por todo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A mi madre, a quien considero un ser lleno de luz y una de las bendiciones directas de Dios en mi vida.

A mi padre, por su inteligencia y por contagiarme su amor por la lectura. Aunque no estés en este plano tu presencia me acompaña siempre.

A mis hermanos, Nicolás y Ricardo por su cariño, apoyo y protección que siempre me han brindado. Siempre me he sentido segura sabiendo que están a mi lado. A Lety, mi hermana de la vida por su cariño y cuyas palabras de ánimo me dan fortaleza. Y a mis sobrinos que forman parte de mi vida. Agradezco muchísimo que estemos juntos.

A Martha Cecilia, mi amiga incondicional con quien comparto la misma profesión, sueños y proyectos. Porque aún en la distancia, estás a mi lado en los momentos de alegría y tristeza apoyándome y brindándome tu cariño. Gracias Melek.

A ti, que has estado a mi lado, que viste crecer mi sueño y me apoyaste y me estimulaste a realizarlo. A ti que me has enseñado que a pesar de las adversidades, más allá de las nubes, está el sol brillando siempre. A ti que has entendido mis tiempos y destiempos, mis desencuentros, mi perfeccionismo y terquedad. 55

A la Dra. Iza Peixoto, por su amistad y cariño. Por el honor de compartir los trabajos de investigación con los que hemos recibido muchas satisfacciones y por los nuevos proyectos que se están gestando.

Al Dr. Juan Manuel Fidalgo, maestro, tutor y amigo, ejemplo de honestidad, respeto y rectitud, por compartir gustoso cada uno de mis logros y por sus valiosos consejos y ser fuente de motivación e impulso a la superación. A la Sra. Laura, su esposa que ha correspondido con gran ternura y afecto a nuestra amistad.

Al Dr. Enrique Nieto y la Dra. Adela Santos por haber participado en mi formación como odontopediatra, por sus enseñanzas dentro y fuera de la escuela, por su amistad y cariño incondicional.

A la Dra. Chelito (QEPD), mi compañera de viajes, maestra y amiga, por su ejemplo para lograr todo lo que se propuso, rompiendo esquemas y adelantándose a su época. En donde esté, Gracias!

Al Dr. Page Caufield, por su ejemplo, sus consejos, orientación y por su sincera amistad. BMMM.

A la Dra. Myriam De la Garza, por su orientación para seguir creciendo en el área de la investigación, por su amistad y por las facilidades otorgadas para realizar parte de este trabajo en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UANL, a su cargo.

Al Dr. Roberto Mercado, por su asesoría y contribución con la Estadística de este trabajo.

Al MC. Ismael Malagón Santiago, por toda su orientación y ayuda incondicional en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos: Norma, Mayra, Roberto, Sergio, Francisco, Lupita, Ismael, Rodolfo, Gustavo, Miriam, Juanjo, Carlos, Anchel, por estar en mi corazón y formar parte de mi historia. Gracias por su cariño.

A Vero, Ester, Karina, David, Andrés, Omar, por las risas y los ratos compartidos.

A mis queridos compadres Mirella y Oscar, Irma y Jesús, por los hermosos días y las noches compartidas. Mi cariño para todos.

A Katia, por su ayuda, por organizar mi tiempo y por ser parte de mi vida.

A Vilma por su disponibilidad, apoyo y cariño. Gracias por su valiosa amistad.

A Mayra, por su ayuda y asistencia en el L1.

Al personal del Instituto de Biotecnología, Cristi, Norma, Edna, Mirna, Josué, Tere, Silvia, por todas sus atenciones y amabilidad.

Al personal de Posgrado de Biología, Carmen, Yadira, muchas gracias por su amabilidad, por su tiempo.

A todas las personas, familiares y amigos que han estado presentes todo este tiempo y a todos aquellos a quienes he desatendido debido a mi trabajo, mis más sinceras disculpas.

Mi sincero agradecimiento

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN	7
3. HIPÓTESIS	9
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos particulares	10
5. ANTECEDENTES	
5.1 Periodontitis	11
5.1.1 Agentes etiológicos	12
5.1.1.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12
5.1.1.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	13
5.1.2 Tratamiento	14
5.2 Plantas medicinales	16
5.2.1 <i>Thymus vulgaris</i>	18
5.2.2 <i>Matricaria chamomilla</i>	19
5.2.3 <i>Croton lechleri</i>	21
5.2.4 <i>Calendula officinalis</i>	22
5.2.5 <i>Juliana adstringens</i>	24
5.3 Biopolímeros	25
5.3.1 Quitosan	26
5.3.2 Pululano	27
5.4 Usos del quitosan y pululano	29

6.	MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	34
6.2	Extractos de plantas	36
6.3	Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos	37
6.3.1	Técnica de microdilución en caldo	38
6.3.2	Técnica de dilución en agar	40
6.4	Biopolímeros	
6.4.1	Elaboración de las películas de quitosan y pululano	40
6.5	Evaluación de las propiedades antimicrobianas de las películas adicionadas con los extractos	43
6.6	Determinación de la vida útil de las películas	44
6.7	Pruebas de solubilidad	46
6.8	Diseño experimental	47
7.	RESULTADOS	
7.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	48
7.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos	48
7.2.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	49
7.2.2	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	51
7.3	Elaboración de las películas de biopolímeros	52
7.3.1	pH	53
7.3.2	Grosor de las películas	54
7.3.3	Resultado de las pruebas de solubilidad	55
7.4	Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas	57
7.4.1	Actividad antimicrobiana de las películas sobre <i>Aa</i>	57
7.4.2	Actividad antimicrobiana de las películas sobre <i>Pg</i>	58
7.4.3	Actividad antimicrobiana de las películas sobre <i>E. coli</i> 43895	59
7.4.4	Actividad antimicrobiana de las películas sobre <i>E. coli</i> 0157:H7	60
7.5	Determinación de la vida útil de las películas	
7.5.1	Humedad relativa	61
7.5.1.1	Efecto de la humedad sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	61
7.5.1.2	Efecto de la humedad sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>P. gingivalis</i>	63
7.5.1.3	Efecto de la humedad sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>E. coli</i> 43895	65
7.5.1.4	Efecto de la humedad sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>E. coli</i> 0157:H7	67

7.5.2	Temperatura	68
7.5.2.1	Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	68
7.5.2.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>P. gingivalis</i>	70
7.5.2.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>E. coli</i> 43895	72
7.5.2.4	Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>E. coli</i> 0157:H7	74
7.5.3	Iluminación	76
7.5.3.1	Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	76
7.5.3.2	Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>P. gingivalis</i>	78
7.5.3.3	Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>E. coli</i> 43895	79
7.5.3.4	Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de <i>E. coli</i> 0157:H7	81
8.	DISCUSIÓN	83
9.	CONCLUSIONES	92
10.	LITERATURA CITADA	96
11.	ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
5.1.	Imágenes de la enfermedad periodontal	11
5.2.	<i>Thymus vulgaris</i>	18
5.3.	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	19
5.4.	<i>Croton lechleri</i>	21
5.5.	<i>Calendula officinalis</i> L.	22
5.6.	<i>Juliana adstringens</i>	24
5.7.	Estructura química del quitosan	19
5.8.	Estructura parcial del pululano	21
6.1.	Técnica de pozo en agar	38
6.2.	Técnica de microdilución en caldo. (a) se observan los pozos con los cinco extractos a diferentes diluciones. La columna 12 usada para controles. (b) concentraciones finales de los extractos	39
6.3.	Preparación de los formulados de polímeros con los extractos de plantas	41
6.4.	Medición del pH de la mezcla de polímero y extracto	42
6.5.	(a) Mezcla de quitosan con extracto de <i>J. adstringens</i> siendo distribuída en las placas molde. (b) Secado de las mezclas de polímeros con los diferentes extractos	42
6.6.	(a) Películas de quitosan y (b) pululano siendo separadas de las placas después de su secado	43
6.7.	Recorte y almacenamiento de los discos de polímeros. (a) perforador de papel; (b) cajas de petri con cada uno de los diferentes polímeros; (c) aspecto de los discos	43
6.8.	Técnica de sensibilidad por difusión de disco en agar	44
6.9.	Placa de 24 pozos conteniendo los discos de los diferentes polímeros con los extractos de plantas	45

6.10.	Discos de polímeros almacenados en el desecador, a una HR del 60%, con y sin luz	45
6.11.	Discos de polímeros almacenados a 25% de HR, con y sin luz	46
7.1.	Zonas de inhibición de crecimiento microbiano	49
7.2.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las diferentes plantas sobre los microorganismos probados	51
7.3.	Resultados de la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de las diferentes plantas	52
7.4.	Resultados del pH de las formulaciones de polímeros adicionados con los extractos de plantas	54
7.5.	Resultados del grosor de las películas de polímeros	55
7.6.	Tiempo de solubilidad de las películas de biopolímeros almacenadas a una humedad relativa del 60%, con y sin luz	56
7.7.	Tiempo de solubilidad de las películas de biopolímeros almacenadas a una humedad relativa del 25%, con y sin luz	57
7.8.	Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	58
7.9.	Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de <i>P. gingivalis</i>	59
7.10.	Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de <i>E. coli</i> 43895	60
7.11.	Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de <i>E. coli</i> 0157:H7	61
7.12.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 60% sobre <i>A. actinomycetemcomitans</i>	62
7.13.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 25% sobre <i>A. actinomycetemcomitans</i>	63
7.14.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 60% sobre <i>P. gingivalis</i>	64
7.15.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 25% sobre <i>P. gingivalis</i>	65
7.16.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 60% sobre <i>E. coli</i> 43895	66

7.17.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 25% sobre <i>E. coli</i> 43895	66
7.18.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 60% sobre <i>E. coli</i> 0157:H7	67
7.19.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una humedad relativa del 25% sobre <i>E. coli</i> 0157:H7	68
7.20.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C sobre <i>A. actinomycetemcomitans</i>	69
7.21.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una temperatura de 4°C sobre <i>A. actinomycetemcomitans</i>	70
7.22.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C sobre <i>P. gingivalis</i>	71
7.23.	Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una temperatura de 4°C sobre <i>P. gingivalis</i>	72
7.24.	Comportamiento de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 43895	73
7.25.	Comportamiento de las películas almacenadas a una temperatura de 4°C en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 43895	73
7.26.	Comportamiento de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 0157:H7	75
7.27.	Comportamiento de las películas almacenadas a una temperatura de 4°C en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 0157:H7	75
7.28.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	77
7.29.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de obscuridad en la actividad antimicrobiana de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	77
7.30.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de <i>P. gingivalis</i>	78
7.31.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de obscuridad en la actividad antimicrobiana de <i>P. gingivalis</i>	79
7.32.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 43895	80

7.33.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de oscuridad en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 43895	81
7.34.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 0157:H7	82
7.35.	Comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de oscuridad en la actividad antimicrobiana de <i>E. coli</i> 0157:H7	82

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
5.1.	Principales aplicaciones del quitosan y pululano	30
6.1.	Cepas bacterianas	35
6.2.	Plantas y compuestos antimicrobianos	36
7.1.	CMI y CMB de los extractos de plantas sobre las cepas probadas	50
7.2.	Medias y desviaciones estándar del pH de las formulaciones	53

NOMENCLATURA

BHA	Agar infusión cerebro corazón
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
H ₂ O	Agua
ATCC	American Type Culture Collection
Co	<i>Calendula officinalis</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
Cl	<i>Croton lechleri</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
°C	Grados Celsius
h	Hora
BHI	Infusión cerebro corazón
Ja	<i>Juliana adstringens</i>
UV	Luz ultravioleta
Mc	<i>Matricaria chamomilla</i>
µL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
nM	Nanómetro
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	Potencial de hidrógeno
P	Pululano
PCI	Pululano- <i>Croton lechleri</i>
PJa	Pululano- <i>Juliana adstringens</i>
PTv	Pululano- <i>Thymus vulgaris</i>
Q	Quitosan
QCl	Quitosan- <i>Croton lechleri</i>
QJa	Quitosan- <i>Juliana adstringens</i>
QTv	Quitosan- <i>Thymus vulgaris</i>
Tv	<i>Thymus vulgaris</i>
Seg	Segundos
PBS	Solución salina de fosfatos
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

1. RESUMEN

La enfermedad periodontal es un proceso infeccioso inflamatorio de los tejidos de soporte de los dientes iniciada por la acumulación de una biopelícula bacteriana que causa reabsorción del hueso y por lo tanto, pérdida de piezas dentales.

Dos de los principales microorganismos que han sido aislados de las muestras de biopelícula subgingival son *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

El tratamiento de la enfermedad consiste en educación de higiene oral, curetaje, cirugía periodontal y quimioterapia que incluye el uso de enjuagatorios con propiedades antimicrobianas y la administración de antibióticos por vía sistémica. Sin embargo, estos pueden llegar a causar resistencia de las bacterias involucradas en el proceso, debido a que tienen que ser administrados por períodos de tiempo prolongados.

A raíz de estos problemas de resistencia bacteriana a los antibióticos y de los efectos secundarios causados por enjuagatorios como la clorhexidina, se han planteado diversas alternativas al tratamiento clásico, resurgiendo el empleo de productos naturales como los biopolímeros y los extractos de plantas, como nuevas fuentes de agentes antimicrobianos.

El quitosán es un polisacárido derivado de la quitina y el pululano es producido por un hongo. Ambos son atóxicos, biocompatibles, biodegradables y por sus propiedades de adhesión a las mucosas pueden ser utilizados como vehículos de liberación de principios activos de diversos compuestos como los extractos de plantas

En ese contexto, el objetivo de este trabajo fue la elaboración de películas a partir de quitosán y pululano, adicionadas con extractos acuosos de *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla* L., *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl. y evaluar, *in vitro*, su actividad antimicrobiana sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Las películas fueron caracterizadas

en cuanto a su pH, grosor, solubilidad, actividad antimicrobiana y vida útil. Esta última consideró la evaluación de las propiedades de las películas almacenadas bajo dos condiciones de humedad relativa, de temperatura y de iluminación.

Los resultados mostraron que las películas elaboradas de pululano sin extracto, pululano con extracto de *J. adstringens* y con *C. lechleri* y quitosan con *C. lechleri* mostraron los mejores resultados sobre cepas de *A. actinomycetemcomitans* mientras que las películas elaboradas de pululano con *T. vulgaris* y *C. lechleri* tuvieron la mejor actividad inhibitoria sobre cepas de *P. gingivalis*.

La humedad relativa y la temperatura no afectaron el comportamiento de las películas, sólo las condiciones de iluminación tuvieron influencia en la actividad antimicrobiana sobre cepas de *P. gingivalis*. Las características de color y forma de las películas se mantuvieron con el paso del tiempo.

En general, todas las películas tuvieron actividad antimicrobiana *in vitro*, sugiriendo así que presentan buen potencial para ser utilizadas como terapia en la enfermedad periodontal.

ABSTRACT

Periodontal disease is an infectious inflammation of supporting tissues of the teeth initiated by the accumulation of a bacterial biofilm that causes bone resorption and therefore, loss of teeth.

Porphyromonas gingivalis and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are two of the most common microorganisms that have been isolated from the subgingival biofilm.

Therapy for periodontal disease consists oral hygiene education, curettage, periodontal surgery and chemotherapy that includes the use of mouthrinses with antimicrobial properties and systemic administration of antibiotics. However, those may eventually cause side effects and resistance of bacteria involved in the process due to they have to be administered for long periods. Because of these problems, there have been raised a number of alternatives to traditional treatment, and a resurgence in the use of natural products such biopolymers and plant extracts, as new sources antimicrobial agents.

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin and pullulan is produced by fungus. Both polysaccharides are non-toxic, biocompatible and biodegradable and have properties of adhesion to the mucosa and can be used as delivery systems of active ingredients of various compounds as plant extracts.

In this context, the objective of this work was the preparation of films from chitosan and pullulan with aqueous extracts of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla* L., *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl. and the evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The films were characterized in terms of pH, thickness, solubility, antimicrobial activity and stability under different conditions of storage. The

latter considered assessment of the properties of the films stored at two conditions of relative humidity, temperature and light.

The results showed that films made of pullulan without extract, pullulan added with extract of *J. adstringens* and *C. lechleri* and chitosan with *C. lechleri* had the best results on strains of *A. actinomycetemcomitans* while the films made of pullulan with *T. vulgaris* and *C. lechleri* had the best inhibitory activity against strains of *P. gingivalis*.

Temperature and relative humidity did not affect the behavior of the films, but lighting conditions influenced the antimicrobial activity against strains of *P. gingivalis*. Characteristics of color and shape of the films were maintained during the testing time. In general, all films had antimicrobial activity *in vitro*, suggesting that both polymers and plant extracts have good potential to be used as therapy for periodontal disease.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal se caracteriza por inflamación de los tejidos de soporte de la estructura dentaria incluídas la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar de soporte.

La gingivitis y la periodontitis son las enfermedades periodontales más comunes. Como en otras infecciones, la interacción bacteria-huésped determina la naturaleza de la enfermedad resultante. Los microorganismos patogénicos pueden producir la enfermedad indirectamente debido, por ejemplo, al efecto de sus toxinas o bien directamente por invasión de los tejidos. La respuesta del huésped a los microorganismos puede ser de protección, de destrucción o ambas dependiendo de la amplia variedad de cambios en los tejidos observados en los pacientes.

Una bolsa periodontal es una profundización patológica del surco gingival y es uno de los signos clínicos de la enfermedad. La formación de la bolsa ocurre por la migración del epitelio de unión a lo largo de la raíz. La destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar ocurre como resultado de factores bacterianos y del huésped.

La gingivitis tiene una prevalencia de más del 80% y en algunas instancias cerca del 100% de la población mundial. La periodontitis afecta aproximadamente al 75% de la población de adultos de los Estados Unidos. La pérdida de hueso alveolar asociada a la periodontitis puede iniciar a los 10 años, sin embargo usualmente empieza en la edad adulta y progresa con la edad. El género, factores socioeconómicos, raza y métodos de detección contribuyen a los resultados de los índices de prevalencia.

En general, microorganismos anaerobios, gram negativos son las principales características asociadas a la mayoría de las bacterias causantes de enfermedades periodontales. Las bacterias comunmente identificadas con esta enfermedad son: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

La terapia se enfoca en identificar, remover y controlar los factores etiológicos y corregir los defectos que esos patógenos han creado. El tratamiento de la mayoría de las enfermedades periodontales consiste en educación de higiene oral, remoción de los cálculos (curetaje), uso de agentes químicos incorporados a enjuagatorios y pastas como clorhexidina, enzimas, fluoruro, aceites esenciales, compuestos cuaternarios de amonio, agentes oxigenantes, triclosan, etc., así como el uso por vía sistémica de antibióticos y antiinflamatorios.

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria que incluye el uso de células vivas como levaduras, bacterias, células de mamíferos, o sus enzimas para la creación de nuevas drogas y mejores tratamientos (Galán, 2007). Los biopolímeros derivados o

presentes en la naturaleza son atractivos por su disponibilidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, que además permiten se les pueden adicionar diversos materiales o drogas para su aplicación en medicina.

Los agentes tópicos y de liberación de fármacos para el control de la enfermedad periodontal, son considerados los más deseables debido a la baja incidencia de efectos secundarios indeseables que se tienen por la vía sistémica.

Por sus propiedades de no toxicidad y ser considerado un biopolímero natural, se han realizado estudios con quitosan (No *et al.*, 2000).

En la actualidad, entre los usos médicos más sencillos del quitosan, podemos mencionar: la producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina, producción de gasas y vendajes tratados con quitosan, cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras, promueve la pérdida de peso (absorbe y compacta las grasas), usado para el control del colesterol, promueve la recuperación de úlceras y lesiones, tiene acción antibacterial, actúa como antiácido, inhibe la formación de placa dentobacteriana, ayuda al control de la presión sanguínea, endurece los huesos (aumenta el contenido de calcio), reduce los niveles de ácido úrico en sangre, además de tener acción antitumoral, así como la utilización del quitosan en la liberación controlada de diferentes principios activos. Recientemente se ha estudiado su aplicación en la liberación nasal de insulina. Una de las características fundamentales del quitosan para ser utilizado en este tipo de aplicaciones son sus propiedades mucoadhesivas, que facilitan la liberación de los principios activos directamente al tracto nasal o perioral y contribuye a que la asimilación del principio sea más rápida y efectiva (Yang, 2002).

El pululano es un polisacárido extracelular producido a partir de almidón por el *Aureobasidium pullulans* (Wolf, 2003). El pululano es un ingrediente sumamente versátil que mantiene una plataforma de tecnología para la innovación del producto. Es un excelente formador de película que puede ser sellada por calor con una buena propiedad de barrera al oxígeno y que también puede ser estampado. En la industria de alimentos, la película de pululano es considerada dentro de lo que se denomina “cubiertas comestibles”, cuyo enfoque es el integrar los sistemas de empaque como parte del alimento. Es importante resaltar, que colorantes, aromas e ingredientes funcionales pueden ser incorporados en la matriz de la película y estabilizados con eficacia. También se emplea como cubierta para tabletas y en la formación de cápsulas en la industria farmacológica. Junto con otros ingredientes como el mentol, carragenano, xantana y timol, el pululano es uno de los principales componentes de las conocidas tiras antisépticas orales Listerine Pocketpaks®, indicadas para eliminar gérmenes de la cavidad oral y para refrescar el aliento.

Las medicinas alternativas han estado ganando popularidad en décadas recientes. Se realizan investigaciones para validar sus propiedades terapéuticas tanto *in vitro* como *in vivo*.

El tomillo *Thymus vulgaris* está constituido por 20- 55% de timol el cual es un excelente antiséptico que pertenece al grupo de los terpenos y que es usado en diversos enjuagatorios bucales y en jarabes para tratar infecciones de vías respiratorias, tos y bronquitis.

Por otro lado la manzanilla *Matricaria chamomilla* contiene flavonoides y aceites esenciales que tienen propiedades sedantes, antiinflamatorias, antiespasmódicas y digestivas.

Debido a los compuestos polifenólicos, lignanos y alcaloideos, la sangre de drago *Croton lechleri* tiene una marcada actividad antiinflamatoria, antioxidante y cicatrizante de piel y mucosas.

Las virtudes medicinales y colorantes de la caléndula *Calendula officinalis* L. son conocidos desde la antigüedad, en especial por los árabes e hindúes. Es una planta tradicionalmente usada en dermatología por su actividad reepitelizante, cicatrizante, antiinflamatoria y antimicrobiana debido a la acción de los flavonoides, triterpenos y carotenos.

El cuachalalate *Juliana adstringens* Schl contiene varios compuestos como el ácido masticadienoico (triterpenos), salicilatos y β -sitosterol, que le confieren sus efectos analgésicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, etc. Se usa para endurecer la encía y lavar heridas, para disolución de cálculos renales, funciona como antidiabético, antiséptico, cicatrizante y antibiótico.

Las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl en combinación con las características físico químicas del quitosan y el pululano los convierten en una buena opción para evaluar su efecto en cultivos de bacterias periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2.1. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION

La enfermedad periodontal tiene una alta prevalencia en el mundo. Es una enfermedad de la encía que destruye los tejidos blandos y el hueso de soporte de la estructura dentaria. Puede causar pérdida de los dientes y, en el peor de los casos, incrementa el riesgo de enfermedades cardíacas o accidentes cerebro vasculares, bebés con bajo peso al nacer y problemas a la salud en general. Su tratamiento consiste en higiene oral, curetaje, uso de enjuagues con antibacterianos y administración de antibióticos con efectos secundarios que causan desórdenes en riñones, hígado, mucosa gástrica, etc.

En una sociedad que demanda la disponibilidad de medicamentos a base de productos naturales sin efectos adversos en la salud y el uso de las nuevas herramientas biotecnológicas en el desarrollo e implementación de materiales renovables obtenidos del metabolismo de algunos microorganismos o bien de productos presentes en plantas o animales, justifican el llevar a cabo este proyecto en el cual se emplearán dos biopolímeros presentes en la naturaleza: el quitosan, producido comercialmente de la quitina a partir de los citoesqueletos de crustáceos y de algunos insectos, y el pululano, producido por el hongo *Aureobasidium pullulans*.

Actualmente se desconoce del uso de polímeros como el quitosan o el pululano *per se*, así como en combinación con los principios activos de los extractos de *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla* L., *Croton lechleri*, *Calendula officinallis* L. y *Juliana adstringens* Schl cuyas propiedades antisépticas, antiinflamatorias, bactericidas y antifúngicas las convierten en una excelente opción para su evaluación en cultivos de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

La originalidad de este proyecto radica en la elaboración de películas a base de productos biodegradables y biocompatibles adicionadas con extractos de plantas cultivadas en nuestro país para probarlas sobre cultivos de bacterias periodontopatógenas. Con todos estos elementos, podría desarrollarse un sistema de liberación de drogas a partir de materias primas de bajo costo, fácil aplicación y con características adecuadas para la función destinada; que sea clínicamente útil como un agente antimicrobiano tópico para el tratamiento de la periodontitis sin tener los efectos secundarios y altos costos de los medicamentos que se tienen en el mercado.

3. HIPÓTESIS

Las biopelículas a base de biopolímeros como el quitosán y pululano adicionadas con extractos de *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla* L., *Croton lechleri*, *Calendula officinallis* L. y *Juliana adstringens* Schl. tienen actividad antimicrobiana en cultivos de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y sirven como vehículos de liberación de los principios activos de los mismos extractos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar biopelículas a base biopolímeros (quitosan y pululano) para su aplicación como vehículo de liberación de los principios activos de extractos de plantas y evaluar su actividad antimicrobiana contra microorganismos periodontopatógenos.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar, *in vitro*, las propiedades antimicrobianas de extractos de tomillo *Thymus vulgaris*, manzanilla *Matricaria chamomilla* L., sangre de drago *Croton lechleri*, caléndula *Calendula officinallis* L. y cuachalalate *Juliana adstringens* Schl en cultivos de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*;
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria CMI y Concentración Mínima Bactericida CMB de cada uno de los extractos;
3. Elaborar biopelículas a base de quitosan y pululano, utilizando los extractos con mayor actividad antimicrobiana;

4. Evaluar el efecto antimicrobiano de las biopelículas adicionadas con los extractos en cultivos de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*;

5. Determinar la vida útil de las biopelículas;

5. ANTEDECENTES

5.1. PERIODONTITIS

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria del periodonto, con base inmunológica, iniciada por la acumulación de una biopelícula bacteriana que se adhiere a los dientes y causa erosión de los tejidos de soporte (Hojo *et al.*, 2008) (Figura 5.1). Esta placa dental es la fuente patogénica de caries dental y periodontitis.



Figura 5.1. (a) Surco gingival patológico; (b) imagen característica de la enfermedad periodontal.

Estudios epidemiológicos recientemente publicados han mostrado una significativa relación entre las enfermedades periodontales y las enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebro-vasculares y bajo peso al nacimiento (Joshi *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2000).

La placa dental es una compleja mezcla de diversas bacterias que se adhieren a las superficies blandas y duras de los tejidos de la boca. Algunas de estas bacterias han sido

identificadas como los agentes etiológicos principales en el desarrollo de caries, gingivitis y enfermedad periodontal (Socransky and Haffajee, 1994).

La gingivitis o inflamación de la encía se caracteriza clínicamente por cambios de color, forma, posición y apariencia de la superficie de la gingiva. Puede haber sangrado y exudado de líquido crevicular en algunos casos.

La periodontitis se presenta con extensión hacia las superficies más profundas del periodonto. Hay formación de bolsa, pérdida de hueso de soporte y movilidad. La periodontitis puede ser localizada o generalizada y se clasifica en periodontitis del adulto o juvenil dependiendo del sitio clínico específico, de los microorganismos participantes y de los factores del huésped que están presentes al momento del diagnóstico.

5.1.1 Agentes etiológicos de la enfermedad

La causa primaria en las formas más comunes de gingivitis y periodontitis son las bacterias. Estas se organizan formando la placa la cual varía de un sitio a otro en la misma boca. Una pequeña cantidad de placa puede ser controlada o tolerada sin causar enfermedad periodontal debido, probablemente, a los mecanismos de defensa del huésped. Cuando una bacteria específica incrementa su número o produce factores de virulencia, o ambos, el medio ambiente pierde su balance y se desarrolla la enfermedad. La enfermedad también puede ocurrir por pérdida de la capacidad de defensa del huésped, local o sistémica (Nisengard and Newman, 1994).

En general, microorganismos gram negativos, anaerobios, son las principales bacterias asociadas a las enfermedades periodontales (Slots and Genco, 1984). *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son las bacterias más comunes identificadas a la fecha (Nisengard and Newman, 1994).

5.1.1.1 *Porphyromonas gingivalis*

Es un cocobacilo anaerobio, gramnegativo de pigmentación negra que ha sido asociado a la etiología de varios tipos de enfermedad periodontal incluida la periodontitis crónica del adulto y la periimplantitis (Quirynen *et al.*, 2005). Esta bacteria es

frecuentemente detectada en bolsas periodontales profundas de pacientes que presentan periodontitis crónica y ocasionalmente en pacientes con tejidos periodontales sanos y sin signos de inflamación. También se le ha implicado con condiciones sistémicas como la arterioesclerosis (Gibson *et al.*, 2004) y la neumonía (Okuda *et al.*, 2005).

Hay mucha diversidad en la virulencia de los microorganismos de individuos sanos periodontalmente y de aquellos con periodontitis. En estudios previos se ha mostrado que los diferentes factores de virulencia están estrechamente relacionados con su habilidad de producir fimbrias, colagenasas y proteasas como la tripsina que le confieren la habilidad para colonizar e invadir los tejidos del huésped.

5.1.1.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Es un miembro de la familia *Pasteurellaceae*. Es un cocobacilo anaerobio facultativo, gramnegativo, no móvil, cuya presencia está elevada en títulos de anticuerpos en suero de sujetos con periodontitis agresiva. Su cultivo primario requiere de un medio selectivo y la presencia de 5-10% de CO₂ (Slots, 1981). Las bacterias aisladas en cultivos de agar, muestran una forma característica de estrella en el centro de su estructura.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans fue originalmente descrito como *Bacterium actinomycetemcomitans* por Klinger en 1912. Otro sinónimo es *Haemophilus actinomycetemcomitans* dado por Potts y col. en 1985 (Norskov y Kilian, 2006).

Son parte de la flora oral humana y en ocasiones ha sido aislado de otras partes del cuerpo como la sangre y el cerebro como causa de endocarditis y abscesos (van Winkelhoff and Slots, 1999). La periodontitis agresiva localizada, anteriormente llamada periodontitis juvenil localizada, afecta a ciertos dientes como los incisivos y premolares y causa pérdida del hueso alveolar y también está asociada a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tonetti and Schmid, 1994).

Los neutrófilos son exitosamente destruidos por la mayoría de los patógenos bacterianos pero el *A. actinomycetemcomitans* es capaz de producir una leucotoxina única que es considerada como el factor de virulencia más importante del microorganismo. La leucotoxina pertenece a la familia de toxinas RTX y está codificada por el gen operon

lktA que contribuye a matar los neutrófilos y monocitos humanos (Guthmiller *et al.*, 2001; Poulsen *et al.*, 2003).

A. actinomycetemcomitans es una bacteria que muestra un diverso potencial de virulencia que incluye mecanismos de evasión de la respuesta inmune y un novedoso mecanismo de unión e invasión de las células huésped, lo cual juega un papel crucial en la patología de la periodontitis agresiva localizada (Henderson *et al.*, 2002).

En el estudio de Wu y colaboradores (2007) en China, encontraron que el gen *lktA* fue significativamente más elevado en bolsas profundas o en sitios de gran destrucción periodontal demostrando la importancia clínica en la patogénesis de periodontitis crónica.

En un estudio realizado en Newark, New Jersey, en 1075 estudiantes Africo-americanos e Hispanos de edades entre 11 y 17 años, se concluye que *A. actinomycetemcomitans* está altamente asociada con el desarrollo de periodontitis agresiva localizada (antes conocida como periodontitis juvenil) y que su detección temprana puede ser usada como un marcador de riesgo para el inicio de la enfermedad y con esto se podrán implementar medidas preventivas efectivas (Fine *et al.*, 2007).

Ambos microorganismos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*) presentes en placa subgingival también pueden ser encontrados en supragingival lo que indica que esas bacterias anaerobias están también presentes en atmósfera aerobia (Mager *et al.*, 2003; Cortelli *et al.*, 2008).

5.1.2. TRATAMIENTO

La terapia periodontal convencional consiste en la remoción de la placa bacteriana (Goodson *et al.*, 2004) y de los productos bacterianos de las superficies radiculares. A pesar de ésto, ciertos patógenos como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* pueden resistir el curetaje, evadir la respuesta del huésped e invadir las células del epitelio a través del líquido crevicular.

Los agentes quimioterapéuticos para el control de la placa se clasifican en primera generación e incluyen a los antibióticos, aceites esenciales, fluoruros, compuestos cuaternarios de amonio, agentes oxigenantes, sanguinarina, triclosán, benzoato de sodio;

y segunda generación, como la alexidina, clorhexidina, antibióticos (tetraciclinas) (Nisengard and Newman, 1994).

El tratamiento para la corrección de las bolsas periodontales incluye el curetaje, raspado y alisado radicular y cirugías de colgajo que, además de causar molestias, son de alto costo económico.

Una medida para eliminar estos patógenos consiste en el uso de antibióticos por vía sistémica como la amoxicilina y la claritromicina (Burrell and Walters, 2008).

Muchos agentes antimicrobianos como la histatina, lactoferrina y lisozimas son producidas en la cavidad oral (Tenovuo *et al.*, 1991). La producción de esos agentes es considerada como uno de los roles de la respuesta inmune innata contra las infecciones bacterianas aunque se conoce poco acerca del mecanismo de interacción entre esos péptidos y las bacterias. Péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana contra bacterias orales fue usado con éxito contra cepas de periodontopatógenos (Ouhara *et al.*, 2005; Bachrach *et al.*, 2007).

En algunas enfermedades que se caracterizan por reabsorción de hueso como la osteoporosis, enfermedad de Paget, cáncer, hipercalcemia, mieloma múltiple y periodontitis, se han usado compuestos que favorecen la regeneración ósea. Los biofosfonatos son compuestos que tienen propiedades antiinflamatorias y que contrarrestan la reabsorción ósea. Fueron usados con éxito en un estudio en ratas en donde se administró este compuesto en el agua de beber y tópicamente, teniendo buenos resultados cuando se inyectó localmente (Shinoda *et al.*, 2008).

Los agentes quimioterapéuticos de liberación local o tópicos son los más deseados por tener menos efectos indeseables que aquellos administrados por vía sistémica. Los enjuagues bucales ofrecen ventajas por su fácil uso sin embargo tienen efecto en la placa supragingival y poco o nulo efecto en la subgingival lo que limita su eficacia sólo a gingivitis pero con poco valor para la periodontitis. Varios tipos de vehículos, como las tiras de acrílico conteniendo antibióticos han sido usados colocándolos subgingivalmente. Estos sistemas son prometedores para terapias en el futuro. Un producto muy estudiado son las fibras de acetato impregnadas de tetraciclinas (Actisite) que es bien tolerado por los tejidos orales.

La clorhexidina al 0.2 % ha estado disponible en Europa desde hace 20 años y en Estados Unidos en una concentración del 0.12% ha sido aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) y la ADA (American Dental Association) pero tiene como efectos adversos la pigmentación del esmalte de los dientes, irritación de las mucosas y alteración o pérdida del sentido del gusto. (Nisengard and Newman, 1994).

Los aceites esenciales contenidos en los enjuagues de Listerine® contienen una mezcla de compuestos fenólicos y metilsalicilato reducen la placa un 25% aproximadamente y el único efecto secundario reportado es la sensación temporal quemante.

Los compuestos cuaternarios de los enjuagues como el Cepacol® y el Scope® exhiben una moderada actividad antiplaca de aproximadamente un 25%. Algunos de sus efectos incluyen la sensación de quemadura de la lengua, irritación de las mucosas y pigmentación menor reversible de los dientes.

El triclosán es efectivo pero es necesario que esté adicionado a otras formulaciones. Es parte de dentífricos como Colgate Gum Protection Formula®, Crest Gum Health® y Mentadent®. Reduce la placa en rangos entre 0 y 30%.

El benzoato de sodio encontrado en el Plax® ayuda en la remoción mecánica de la placa, sin embargo, en diversos estudios se reporta un mínimo efecto.

Algunos antibióticos inhiben la formación de placa por períodos cortos de tiempo. En situaciones limitadas se emplea en algunos tipos de enfermedad periodontal, como la tetraciclina que es útil en el tratamiento de periodontitis juvenil por su acción sobre *A. actinomycetemcomitans*. Sin embargo, su capacidad de reacciones de hipersensibilidad y resistencia a los antibióticos por su prolongado uso, debe ser reservado para tratamientos de infecciones sistémicas más que para control de placa. La tetraciclina, clindamicina y metronidazol, como cualquier antibiótico, es necesario evaluar sus efectos adversos antes de prescribirlos. Se ha reportado que las tetraciclinas causan desórdenes en riñones e hígado; la clindamicina puede causar serios desórdenes gastrointestinales incluyendo colitis; y el metronidazol que es causante de cáncer en ratas y causa mutagénesis bacteriana (Nisengard and Newman, 1994).

5.2. PLANTAS MEDICINALES

Hay evidencia de que los Neandertales que vivieron hace 60,000 años ya usaban plantas como medicinas para sus enfermedades, algunas veces con resultados terapéuticos que curaban los síntomas pero también ocurría una gran cantidad de envenenamientos. De un cuarto o la mitad aproximadamente de los productos farmacéuticos a base de plantas dispensados en los Estados Unidos, muy pocos están indicados para su uso como antimicrobianos (Murphy, 1999).

Se ha reportado que, en promedio, dos o tres antibióticos derivados de microorganismos son producidos cada año (Clark, 1996). Por otro lado, muchas personas están actualmente interesadas en tener más libertad en su cuidado médico. Una gran cantidad de compuestos de plantas se consiguen fácilmente en tiendas de comidas y productos naturales.

Se estima que hay aproximadamente entre 250,000 y 500,000 especies de plantas en el mundo (Borris, 1996). Sólo un pequeño porcentaje (1 al 10%) de ellas, son usadas como comida tanto por humanos como por animales. En la Biblia hay descripciones de aproximadamente 30 plantas curativas como el mirro. En la farmacopea de culturas como la asiática y la árabe, hay una gran cantidad de plantas con propiedades curativas. En Estados Unidos, el uso de plantas medicinales viene de los nativos americanos y de los migrantes europeos que llegaron ahí en el siglo 19.

Las plantas tienen sustancias aromáticas como los fenoles, terpenoides, quinonas y taninos que son metabolitos secundarios. El tarragon y el tomillo contienen ácido cafeico el cual es efectivo contra virus, bacterias y hongos (Murphy, 1999).

La producción de los principios activos de las plantas depende de una serie de factores durante el crecimiento vegetal y de los procedimientos después de la colecta.

Para garantizar la estandarización de un producto fitoterapéutico se requiere conocer la influencia de otros factores como la calidad química de la materia prima vegetal ya que las plantas pueden presentar variabilidad a lo largo de las diversas estaciones del año y las diferentes formas de extracción.

Un factor a considerar durante la colecta es el estado de desarrollo de la planta pues se han observado grandes variaciones en el contenido de los principios activos de

acuerdo a la época de la colecta (Oliveira *et al.*, 1998). También se menciona que, de acuerdo a las sustancias presentes en la planta, existen horarios en que su concentración es mayor (Vigo *et al.*, 2004).

5.2.1. *Thymus vulgaris* (Tomillo)



Figura 5.2. *Thymus vulgaris*

El tomillo es una planta aromática, herbácea, perenne nativa del Mediterráneo occidental, en especial del sur de Italia. Crece tanto en exteriores como en interiores. La mayoría de las variedades crecen entre 10 y 40 cm. de altura. Las hojas son lineares, hasta de 15 mm., de color verde-gris oscuro, flores color lila o blanco. Los egipcios usaban el tomillo para embalsamar. Los griegos lo usaban en sus baños, como antídoto para las mordeduras de serpientes y como incienso en sus templos porque creían que era fuente de valentía. Al parecer, fueron los monjes benedictinos quienes la introdujeron a Centroeuropa. Se cultiva en casi todos los países como planta aromática culinaria.

El aceite de tomillo contiene un 40% de timol el cual es un excelente antiséptico y es usado en diversos enjuagatorios bucales.

T. vulgaris tiene como principales componentes al timol y carvacrol, que han demostrado eficacia antibacteriana. Mediante métodos de extracción y de separación bioguiados, utilizando tanto bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Nostro *et al.*, 2007) y gramnegativas: *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Rosooli and Mirmostafa, 2003), así como hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Mucor* spp. y

Fusarium oxysporum) o levaduras como *Candida albicans* (Pinto *et al.*, 2006), se ha conseguido el aislamiento e identificación por métodos espectroscópicos de timol y carvacrol, fenoles volátiles monoterpénicos, como principales sustancias responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica. También ha mostrado efectos contra *Entamoeba histolytica*. (Behnia *et al.*, 2008). El extracto etanólico (30%) de las hojas y flores de tomillo, demostró efectos antitusivos y expectorantes (Alonso, 2007). Antes del advenimiento de los antibióticos modernos, era usado en apósitos. El tomillo a mostrado ser efectivo en el tratamiento de hongos resistentes al fluconazol y que afectan con mucha frecuencia las uñas de los pies (Pozzati *et al.*, 2008).

El timol (2-*isopropil-5-metil-fenol*) es una sustancia cristalina incolora con un olor característico que está presente en la naturaleza en los aceites esenciales del [tomillo](#) o del [orégano](#). Pertenece al grupo de los [terpenos](#).

El timol se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes etc. Una disolución de 5 % timol en etanol se utiliza para la desinfección dermal y contra infecciones con hongos.

La eliminación de timol y carvacrol por vía respiratoria produce una actividad antiséptica respiratoria. Por su actividad antibacteriana, el tomillo tiene interés también como antiséptico urinario y de la cavidad bucofaríngea, así como para el lavado de heridas.

5.2.2. *Matricaria chamomilla* L. (Manzanilla)



Figura 5.3. *Matricaria chamomilla* L.

Se trata de una planta herbácea anual perteneciente a la familia de las Compuestas, caracterizada por presentar una altura de 30 cm aproximadamente. Cada rama presenta en su extremo el botón floral de color amarillo- y lígulas de color blanco dorado.

Oriunda de Europa, norte de África y Asia Occidental, siendo cultivada en toda América. La especie fue llevada a México en épocas de la conquista y rápidamente fue extendiéndose al resto del continente. La parte utilizada está compuesta por las inflorescencias secas. Presenta sabor levemente amargo y olor aromático característico.

Composición Química:

Aceite esencial (0.3%-1.5%). Es el componente más importante que se obtiene de las cabezuelas de la planta y constituyen el grupo lipofílico de la droga. Más del 50% del total de la esencia se compone de la siguiente manera:

Azulenos (26-46%). Sesquiterpenos. Lactonas sesquitérpicas. Carburos terpénicos: principalmente camuzaleno (6-15%) y en menor medida guajazuleno. Los azulenos se emplean en pastas dentífricas por sus propiedades antiinflamatorias de la encía.

Los flavonoides (1-3%) son junto con el aceite esencial, los compuestos responsables de todos los efectos farmacológicos de las cuales destaca su actividad sedante, antiinflamatoria, antiespasmódica y digestiva (Alonso, 2007). En animales, el flavonoide *apigenina* ha demostrado un efecto antiinflamatorio *in vitro* superior al evidenciado por la indometacina, persistiendo 18 horas después de su administración (Retamar, 1988). Por otro lado también demostró *in vitro* un efecto inhibitorio de la activación transcripcional de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) así como un marcado efecto inhibitorio de la activación transcripcional de la óxido nítrico sintasa inducible en lipopolisacáridos activados por macrófagos. La importancia de estos resultados radica en la relación existente en los procesos de inflamación y la carcinogénesis (Liang *et al*, 1999). El poder antiinflamatorio tópico resultó de igual magnitud que el demostrado por la benzidamida.

La actividad antimicrobiana se ha probado en especies de *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* y fungicida frente a *Candida albicans* debido principalmente al camuzaleno.

5.2.3. *Croton lechleri* (Sangre de Drago)

Sinonimia: *Jatropha Dioica*



Figura 5.4. *Croton lechleri*

Se trata de un árbol o arbusto, perteneciente a la familia de las Euforbiáceas, caracterizado por presentar un diámetro de 40 cm y una altura entre 5 y 6 metros; corteza blanquecina de 20-25 mm. de espesor provista de un látex rojizo, ramaje cubierto por pelos estrellados, hojas anchas, ovales, cordiformes y plurinervadas; pecíolos alargados. En América, este género cuenta con 400 especies, de las cuales 5 producen látex rojizo: *C. xalapensis* en México y Centroamérica. Es originaria de las regiones templadas de Sudamérica (en especial Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador y Brasil) y también de África.

Composición química:

Alcaloides, de los cuales la taspina es la más importante, con una concentración en el látex del 9% sobre el peso seco. Lignanos como el dihidro-benzofurano 3,4-O-dimetilcedrusina. Tiene además derivados de la catequina (epicatequina, galocatequina, epigalocatequina), clerodanos (ácido hardnickico), polifenoles, proantocianidina B-1, B-4 y SP-303. El conjunto de estas sustancias representan más del 90% del peso seco de la planta.

Su acción farmacológica se centra en su acción cicatrizante en piel y mucosa gástrica, antiinflamatorio y antioxidante (Alonso, 2007).

En el campo odontológico, la resina también ha sido ensayada con éxito bajo la aplicación tópica en casos de alveolitis seca dolorosa, siendo su efecto cicatrizante comparativamente superior a los productos convencionales. Esta resina ha sido empleada con el fin de reemplazar al eugenol y al óxido de zinc como sustancias cementantes de conductos radiculares, con el propósito de disminuir el 7.38% de fracasos o complicaciones observados en este tipo de trastornos (Alonso, 2007).

La actividad antiinflamatoria está determinada en mayor medida por el lignano dihidrobenzofurano 3',4'-O-dimetilcedrucina (Chen, *et al.*, 1994). Mostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *E. coli* (McRae *et al.*, 1988). El oligómero SP-303 (PROVIR®) está patentado desde 1993 por Shaman Pharmaceuticals Inc. (Alonso, 2007).

5.2.4. *Calendula officinalis* L. (Caléndula)



Figura 5.5. *Calendula officinalis* L.

Se trata de una planta aromática anual, perteneciente a la familia de las Asteráceas (Compuestas), caracterizada por presentar una altura cercana al medio metro; tallos erectos y ramificados; hojas oblongo-lanceoladas, pilosas por ambas caras, de 5 a 15 cm. de largo y márgenes dentados; capítulo grande (3- 7 cm de diámetro), conformado por flores ligulares de color amarillo-rojizo, brillantes y dispuestas en filas simples o dobles; y también por flores tubulares centrales. Las flores hacen su aparición durante gran parte del año. El fruto es un aquenio espinoso y curvado (Alonso, 2007).

Es oriunda de la región mediterránea (algunos piensan que proviene de Egipto) y se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo como planta ornamental. Por lo general es cultivada en zonas de clima templado, tolerando todo tipo de suelos, preferentemente arcillosos, de ahí que se emplee extensamente en jardines urbanos.

La droga vegetal está constituida por las inflorescencias o capítulos enteros. También se utilizan los flósculos aislados. En menor medida se emplean las hojas. Los pétalos suelen ser sustitutos del azafrán y pueden ser incorporados a ensaladas, caldos, y tortillas. Los holandeses la utilizan para darle un toque original a sus sopas y estofados. La cocina francesa la añade a sus pescados, carnes y, en algunos casos, a las bebidas.

Composición química:

El aceite esencial presenta una concentración variable, hasta 0.12% en las flores liguladas y hasta 0.4% en el receptáculo. Es abundante en mono y sesquiterpenos oxigenados: carvona, geranilacetona, cariofilencetona, mentona, isomentona, γ -terpineno, γ y δ -cadineno, cariofileno, pedunculatina, etc. Saponósidos: calendulósidos A, B, C, D, D2, F, G y H. Carotenoides: calendulina, β -caroteno, licopeno, neolicocina, rubixantina, violaxantina, citroxantina, zeína, crisantemoxantina, flavoxantina, auroxantina, luteína, etc. Los carotenoides son compuestos relativamente estables, siendo solubles en grasas e insolubles en agua. Esto es importante cuando se deba seleccionar un medio de extracción para la elaboración de preparados a base de caléndula.

Flavonoides: En las flores liguladas hasta 0.88% y en el receptáculo hasta 0.33%. Constituidos principalmente por derivados del quercetol y del isoramnetol. Alcoholes triterpénicos pentacíclicos: arnidiol, faradiol, lupol, taraxasterol, etc. Polisacáridos: ramno-arabino-galactano y dos arabinogalactanos. Ácido málico (6.8%), mucílago (1.5-4%), resina, goma, taninos, poliacetilenos, esteroides, ácido salicílico. Tiene actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Entamoeba histolytica* (Alonso, 2007).

5.2.5. *Juliana adstringens* Schl. (Cuachalalate)

Sinonimia: *Amphipterygium adstringens*.



Figura 5.6. *Juliana adstringens*

El cuachalalate es la corteza seca del tronco del árbol *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltdl. Esta especie es nativa de México y pertenece a la familia de las Julianáceas. Otros nombres comunes con los que se conoce son: palo de rosa, cuachalala, maxiterán y volador. Por lo general crece en selvas bajas caducifolias en los estados de Jalisco, Colima, Guerrero, México, Puebla, Nayarit, Morelos, Michoacán, Oaxaca y la Cuenca del Balsas. Regularmente la especie existe en la tierra caliente, en los climas semitropicales y templados. El vocablo “cuachalalate” proviene del término náhuatl “cuauchachalatli”, que significa árbol de la chachalaca. Las infusiones de la corteza son usadas para tratar numerosas condiciones como la coleditiasis, úlceras, fiebres, gastritis, úlceras gástricas (Navarrete *et al.*, 2005), cáncer gastrointestinal, enfermedades de las encías y otras enfermedades inflamatorias (Olivera *et al.*, 1999).

Composición Química: Investigaciones fitoquímicas de la corteza de *A. adstringens* han resultado en el aislamiento e identificación de varios triterpenoides (Soriano *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1989). Otros compuestos aislados de la corteza del

cuachalalate son el ácido masticadienoico y el ácido 3 α -hydroxymasticadienoico (Navarrete *et al.*, 1998). El ácido masticadienoico es un triterpeno que deriva del escualeno al igual que los esteroides como el colesterol, el cual a su vez, es precursor de los ácidos biliares, la vitamina D, hormonas sexuales y de corticosteroides.

Otro de los componentes que se encontraron en el cuachalalate es el β -sitosterol (Arrieta *et al.*, 2003). Tal compuesto es el fitosterol más abundante en la dieta. La capacidad para disminuir los niveles de colesterol es debida en gran parte al β -sitosterol.

Un tercer tipo de compuestos son los ácidos salicílicos. Los salicilatos en general son inhibidores reversibles de la ciclooxigenasa excepto el ácido acetilsalicílico. (Olivera *et al.*, 1999).

El ácido anacárdico contenido en la corteza (Navarrete *et al.*, 1989) ha mostrado actividad anti Helicobacter (Castillo *et al.*, 2007) y antitumoral (Oviedo *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2008).

Los demás efectos reportados del cuachalalate pueden deberse a la acción de taninos presentes en la planta. Las drogas que poseen taninos son útiles en la protección de boca y garganta ante eventos inflamatorios y han sido empleadas como antídotos en la intoxicación de metales pesados, alcaloides y glicósidos.

5.3 BIOPOLÍMEROS

Uno de los desarrollos más importantes de los últimos años es la investigación de los biopolímeros como recursos biotecnológicos que tienen propiedades únicas de ausencia de toxicidad, degradables y biológicamente compatibles.

Entre los principales biopolímeros utilizados en la elaboración de películas se encuentran el almidón, la celulosa, el ácido poliláctico, el quitosán y el pululano.

Los polímeros juegan un rol importante en la industria de los alimentos, en la encapsulación de lípidos y sabores volátiles que son susceptibles a oxidación y degradación. Aunque las proteínas son reconocidas también como buenos materiales de recubrimiento, los polisacáridos son más comúnmente usados debido a su funcionalidad, bajo costo y aspectos de seguridad.

Dentro de los polisacáridos más comúnmente estudiados está el quitosan. Este polisacárido presenta diversas características de interés como es su acción antimicrobiana (bactericida y fungicida), estimula la proliferación celular (Muzzarelli, 1996) también por ser biodegradable y biocompatible (Sharma, 2001).

5.3.1 Quitosan

Es producido comercialmente por la quitina, obtenida por los desechos de los exoesqueletos de los crustáceos y de algunos insectos.

Chitosan, α (1 \rightarrow 4)-unido a 2-amino-2-deoxy-s-D-glucan, es preparado por N-desacetilación de la quitina, la cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Kurita, 1998).

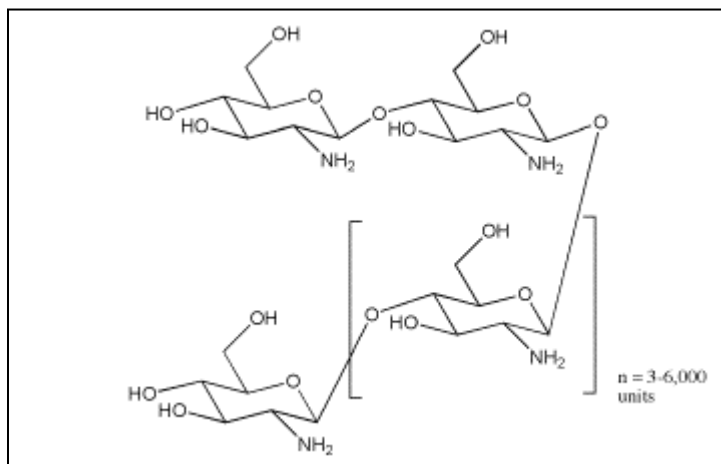


Figura 5.7. Estructura química del quitosan que consiste en *N*-acetyl-D-glucosamina y unidades de glucosamina.

Se ha demostrado que el quitosan es un material invaluable en el campo de la biotecnología y la ingeniería biomédica debido a su gran variedad de aplicaciones (Sharma, 2001).

El quitosan es insoluble en agua, ácidos concentrados, álcalis, alcohol y acetona, siendo completamente soluble en soluciones de ácidos orgánicos cuando el pH es menor a 6. Algunos ácidos inorgánicos como el nítrico, perclórico o fosfórico pueden ser utilizados en la preparación de soluciones de quitosan, mientras la solución sea

mantenida bajo agitación por un largo período para que pueda haber una completa disolución del polisacárido.

El quitosán es un excelente floculante debido a la presencia de grupos amino (NH_3) en su estructura, los cuales pueden interactuar con coloides cargados negativamente. Otra importante propiedad del quitosán se refiere a su capacidad de unión a iones metálicos por lo que resultan de utilidad en la quelación de hierro, cobre y magnesio. Esto posibilita su utilización en procesos de remoción de iones de metales pesados, tales como plata, cadmio, níquel y cromo que se encuentran encima de los límites de tolerancia o permitidos.

Actualmente, las mayores aplicaciones del quitosán están centradas en la purificación de agua, en el procesamiento de alimentos y en la quelación de iones metálicos.

Kurita (1998) evaluó el efecto del peso molecular del quitosán y su actividad antibacteriana de contra especies de *Streptococcus* además de actividad fungicida, hemostática y antitumoral, y constató que a mayor peso molecular, mayor la inhibición del crecimiento bacteriano. También Muzzareli *et al* (1990), encontró propiedades antimicrobianas y antifúngicas en el quitosán.

En la industria alimentaria es usado por sus propiedades antimicrobianas contra microorganismos que producen la descomposición de alimentos (Hoon *et al.*, 2001).

Las películas sirven para proteger los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos. Las películas de quitosano son claras, fuertes y flexibles. Se forman por moldeo de la solución acuosa y sirven como barrera al oxígeno de frutas y otros alimentos.

Sus aplicaciones son muy amplias: en biomedicina, biotecnología, agricultura, cosmético, shampoos, lentes de contacto, emulsiones, adhesivos, cubiertas, etc.

5.3.2 Pululano

Es un polisacárido de origen microbiano (*Aureobasidium pullulans*) que es comestible y biodegradable. Las películas de pululano formadas en solución acuosa son claras, incoloras, insaboras, buenas barreras al oxígeno, resistentes al aceite y sellables

por calor (Kawahara *et al.*, 2003). Las coberturas de pululano se han usado exitosamente para prolongar la vida de anaquel de los alimentos (Alemán, 2006). El pululano y sus derivados tienen numerosos usos demostrados en la industria de alimentos, farmacéutica, de manufactura y electrónica.

El pululano es polisacárido agua-soluble natural, producido del almidón por fermentación. Está disponible en la forma de polvo blanco, inodoro, insípido, y muy estable. El pululano es esencialmente un glucano lineal que consiste principalmente de unidades de maltotriosa (3 moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4) unidas por enlaces α -1 \rightarrow 6.

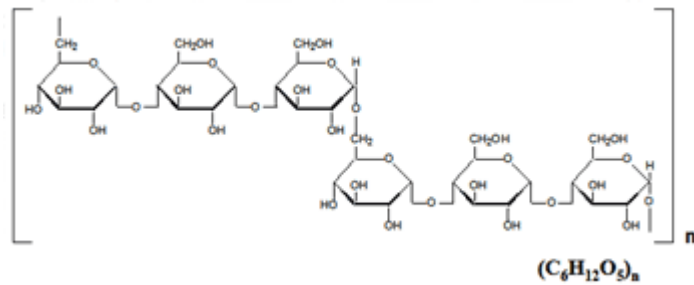


Figura 5.8. Estructura parcial del Pululano

Su patrón único de enlaces, confiere al polímero distintivos rasgos físicos que incluyen las propiedades adhesivas, la capacidad para formar fibras, el moldeo por compresión y la fuerza oxígeno-impermeable de sus películas. De hecho, las películas y fibras de pululano son parecidas a algunos polímeros sintéticos derivados del petróleo.

Aunque es más caro que estos plásticos, los productos de pululano son comestibles y biodegradables y el pululano no derivado es altamente soluble en agua. Las películas son transparentes y pueden medir de 5-60 μ de grosor.

El pululano seco es un polvo blanco, no higroscópico que se disuelve rápidamente en agua fría o caliente. Es no tóxico, no mutagénico, no tiene olor ni sabor y es comestible.

Bauer (1938) realizó las primeras observaciones del polímero extracelular producido por *A. pullulans*, y Bernier (1958) aisló y empezó a caracterizar el

polisacárido, Bender y col. (1959) estudiaron este nuevo glucano y lo nombraron “pululano” (Leathers, 2003).

La producción comercial empezó en 1976 por Hayashibara Company, en Okayama, Japón. La producción de pululano fue una proyección extra del negocio original de producción de jarabe de almidón de Hayashibara, fundada en 1883. Los films de pululano fueron comercializados por Hayashibara en 1982. La compañía permanece como principal proveedor de pululan en la actualidad.

Los cultivos de *A. pullulan* son agitados y aereados a una temperatura de 30°C. El rendimiento es más del 70% del substrato inicial. Las condiciones de cultivo y la selección de las cepas son importantes para obtener pululano de alto peso molecular el cual es relativamente libre de melanina. Las células de *A. pullulan* son removidas por filtración del medio de cultivo diluído. La melanina es removida por tratamiento con carbón activado y el pululano es recuperado y purificado por precipitación con solventes orgánicos, particularmente alcoholes. El pululano requiere una purificación mayor por medio de ultrafiltración de resinas de intercambio iónico. *Aureobasidium* es considerada una “levadura negra” y la melanina que es removida es el único problema que incrementa el costo de producción de pululano (Leathers, 2003).

La producción de pululano por Hayashibara es aproximadamente de 300 toneladas por año. El pululano grado alimenticio se vende en Japón a un costo aproximado de US \$20/kg, y el de grado farmacéutico por aproximadamente US \$25/kg.

5.4. Usos del quitosan y el pululano.

La biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad y bajo grado de toxicidad de los polímeros como el quitosan y el pululano hace que sean muy atractivos para diversas aplicaciones como biomaterial en área médica y farmacéutica (Galaev and Mattiason, 2008), así como en la industria alimentaria (Tabla 5.1).

La incorporación de fármacos o principios activos con propiedades antimicrobianas, se presenta como una de las innumerables aplicaciones en la industria farmacéutica. Numerosos sistemas de liberación de drogas son descritos en la literatura

en los cuales el principio activo puede ser incorporado o disuelto en la misma estructura de las películas durante las diferentes etapas de preparación de las mismas (Wang *et al.*, 2007).

Las propiedades físicas y químicas de las membranas presentan un importante papel en la determinación de la tasa de liberación de drogas incorporadas, siendo que, el medio utilizado para la disolución de un fármaco puede tener efecto decisivo en su cinética de liberación (Wang *et al.*, 2000).

Dentro de las etapas comúnmente empleadas en el proceso de elaboración de películas es el empleo de soluciones de quitosan del 1 al 5% diluido en ácido acético, neutralización y (o) estabilización con hidróxido de sodio y el uso de placas de Petri como moldes.

El quitosan y el pululano pueden ser empleados en forma aislada o en combinación con otros compuestos, observando una mejoría en sus características físicas, mecánicas y (o) biológicas. Algunos de los agentes que son utilizados en conjunto con estos materiales son: alginato (Wang *et al.*, 2001), gelatina (Cheng *et al.*, 2003), fibroína (Kweon *et al.*, 2001), agentes antimicrobianos (Loke *et al.*, 2000), entre otros componentes.

Tabla 5.1. Principales aplicaciones del quitosan y pululano

Área industrial	Área de la salud
Purificación de agua residual de industrias	Agente de absorción de grasas en la dieta
Estabilizante de aceites en preparaciones alimenticias	Reducción de colesterol LDL
Estabilizante de aromas	Regeneración de piel
Medio de cambio iónico	Antiácido
Aditivo de cosméticos y shampoos	Auxiliar en el control de presión arterial
Absorbente en la remoción de metales pesados	Regenerador de estructura ósea
Protección bactericida de semillas	Reducción del nivel de ácido úrico
Estabilizante de frutas y verduras perecederos	Promotor de pérdida de peso
Agente para inmovilización de microorganismos	Bactericida/antiviral
Cubiertas de alimentos	Inhibidor de la formación de placa dental
	Auxiliar en la absorción de calcio
	Membrana artificial
	Elaboración de lentes de contacto
	Vehículos de liberación de drogas y vacunas
	Elaboración de suturas
	Elaboración de tabletas y cápsulas
	Adhesión de placas dentales
	Refrescantes del aliento

Los polímeros biodegradables han encontrado uso en aplicaciones dentales. Son empleados para llenar la cavidad alveolar tras la extracción de dientes, las partículas de los polímeros porosos ayudan a que la cicatrización sea más rápida. Como membranas en la Regeneración Guiada de Tejidos (GTR), para evitar la migración epitelial después de una cirugía periodontal. La fijación hace que las células epiteliales tengan más apoyo y que haya un lento de crecimiento del tejido conectivo, incluyendo ligamentos y células proliferativas. Tres ejemplos de estos materiales RTG son Resolut de WL Gore (Flagstaff, AZ), Atrisorb de Atrix Laboratories (Fort Collins, CO), y malla de Vicryl Ethicon.

En el campo de la medicina, diversos estudios han demostrado la capacidad del quitosán para reducir de forma efectiva la absorción de grasa de la dieta, reducir la presión sanguínea y disminuir los niveles de colesterol sérico. Esto se produce gracias a un mecanismo de formación de enlaces iónicos que sirven para fijarse a diferentes tipos de aniones tales como ácidos grasos libres, y a su capacidad de formar micelas con el colesterol.

Sus propiedades bioadhesivas y antimicrobianas brindan efecto paliativo como recubrimiento de lesiones en boca como candidiasis y aftas orales (Aksungur *et al.*, 2004). Como vehículo en la liberación prolongada de antibióticos (San *et al.*, 2009; Ramdas *et al.*, 1999; Bhattarai *et al.*, 2006).

La quitina y el quitosán han sido usados desde la antigüedad para acelerar la curación de heridas. Por ejemplo, los antepasados de Corea usaban la quitina en el tratamiento de abrasiones (obteniéndola a partir de las plumas de calamar) y los antepasados de México aplicaban quitosán para la aceleración de la cicatrización de heridas (obteniéndolo de las paredes celulares de algunos hongos).

El quitosán presenta baja solubilidad a pH fisiológico. El quitosán es soluble sólo en soluciones acuosas ácidas que tengan un pH menor a 6.5. Por esta razón ha sido empleado en la liberación de drogas colon-específicas (Jain *et al.*, 2007; Shimono *et al.*, 2002, Tozaki *et al.*, 1997).

La utilización del quitosán en la liberación controlada de diferentes principios activos, como la liberación nasal de vacunas. Recientemente se ha estudiado su aplicación en la liberación nasal de insulina (Dyer *et al.*, 2002). Una de las características fundamentales del quitosán para ser utilizado en este tipo de aplicaciones son sus propiedades mucoadhesivas, que facilitan la liberación de los principios activos directamente al tracto nasal o perioral y contribuyen a que la asimilación del principio sea más rápida y efectiva (He *et al.*, 1999).

En el 2007, El-Kamel y *col.* desarrollaron una película de liberación de metronidazol para el tratamiento de enfermedad periodontal. Ellos concluyen que se requirió una menor concentración del medicamento que el usado por vía sistémica para obtener buenos resultados y que su uso es cómodo para ser aplicado por el propio paciente.

Son diversos los usos del quitosán como vehículo de liberación de drogas: liberación de ketorolaco en mucosa nasal (Chelladurai *et al.*, 2008), en películas de liberación ocular de Gatifloxacina, una fluoroquinolona de cuarta generación que es usada para tratar la conjuntivitis bacteriana (Gorle and Gattani, 2009).

El quitosan ha sido usado para ayudar a la reparación espontánea del tejido de los meniscos, lo cual es extremadamente difícil. Los resultados indican que este polisacárido natural es bien tolerado por el líquido sinovial ya que favorece y estimula el proceso de reparación de ese tipo de lesiones (Muzzarelli, 2009).

La diabetes mellitus es generalmente controlada con la administración de medicamentos orales o con el uso de inyecciones de insulina. La insulina oral es una promesa en el campo experimental. Se estudió un sistema adhesivo de liberación de insulina para el control de los pacientes diabéticos. Los polímeros naturales como el quitosan y el alginato están encontrando muchas aplicaciones en la industria de la biotecnología como agentes formadores de películas de alta porosidad a los cuales se les agregan medicamentos como la insulina la cual es liberada lentamente y las películas son biodegradadas normalmente (Sarmiento *et al.*, 2007).

Películas de quitosan/gelatina fueron preparadas por evaporación del solvente y caracterizadas por su permeabilidad al oxígeno transparencia óptica y propiedades mecánicas en la elaboración de lentes de contacto. El estudio confirma que sus propiedades de permeabilidad, transparencia y biocompatibilidad, podrían ser potencialmente explotados para la elaboración de lentes de contacto (Xin and Tian, 2004).

Los biopolímeros a base de quitosan resultaron efectivos en la reducción de la hidrofobicidad y la adhesión de *C. albicans* a células, las cuales son importantes factores de virulencia relacionados con la colonización de los tejidos blandos del hospedador o superficies acrílicas presentes en el sistema estomatognático (Azcurra *et al.*, 2006).

El pululano puede ser usado para incorporar aromas, colorantes y otros ingredientes activos. Debido a sus excelentes propiedades de flexibilidad estructural, alta solubilidad y capacidad de servir como barrera al oxígeno, puede ser usado para propósitos médicos como industriales. En forma de película, puede ser usado en la elaboración de cubiertas para tabletas y en la formación de cápsulas en la industria farmacológica. Estas películas permiten un nuevo sistema de liberación para algunos ingredientes como los medicamentos (Lee *et al.*, 1999).

Es usado como fibra dietética en ratas y humanos (Oku *et al.*, 1979). Como prebiótico promueve el crecimiento de bifidobacterias (Mitsuhashi *et al.*, 1990).

El pululano y sus derivados exhiben propiedades adhesivas (Hijiya and Shiosaka, 1975) y puede ser usado como compuesto para cicatrización de heridas (Leung *et al.*, 2001) y como adhesivo en prótesis dentales removibles.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas analizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 6.1.

Los estudios experimentales *in vitro* se realizaron con cepas procedentes de la American Type Culture Collection y elegidas por ser consideradas como los principales microorganismos causantes de enfermedades periodontales.

Para la preparación de los inóculos bacterianos se procedió a la siembra e incubación de las bacterias en diferentes medios de cultivo.

Cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fueron activadas en la cámara de anaerobiosis (Plans Labs, Lansing, Mich.) y sembradas en caldo de tripticaseína de

soya, infusión cerebro-corazón, en caldo Mueller-Hinton y en caldo Mueller-Hinton adicionado con extracto de levadura y se incubaron bajo condiciones de anaerobiosis a 35°C por 24 horas.

Cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 fueron activadas en cámara de anaerobiosis y posteriormente sembradas en caldo de tripticaseína de soya, infusión cerebro-corazón, en caldo Mueller-Hinton y en caldo Mueller-Hinton con extracto de levadura. Se incubaron a 35°C por 24 horas en condiciones de 5% de CO₂ empleando una jarra de anaerobiosis y colocando un sobre de Gaspak (BD GasPak™ EZ).

Escherichia coli ATCC 43895 y *Escherichia coli* 0157:H7, fueron usadas como bacterias de control negativo por ser ampliamente empleadas para pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Se activaron en la campana de flujo laminar (Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet), sembrándolas en los diferentes medios de cultivo empleados con las cepas de periodontopatógenos.

Se hizo un cepario de cada uno de los microorganismos empleados, preparando criotubos que contienen 700 µL de caldo, 200 µL de glicerol y 100 µL de inóculo. Los viales se mantienen en el REFCO a -70°C.

A partir de la resiembra de las cepas activadas, se prepararon suspensiones celulares de 10⁸ UFC/mL en solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) para cada uno de las pruebas y se ajustó a la concentración correspondiente al 0.5 de la escala de McFarland y mediante un espectrofotómetro con una longitud de onda de 625nm se ajustó a un rango de 0.08 a 0.1, equivalente a 1.5×10⁸ UFC/mL.

Tabla 6.1. Cepas bacterianas

Descripción	ATCC Number	Fuente	Condiciones de crecimiento
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	American Type Culture Collection	Anaerobiosis
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	43718	American Type Culture Collection	5% CO ₂
<i>Escherichia coli</i>	43895	American Type Culture Collection	Aerobiosis
<i>Escherichia coli</i>	0157:H7	American Type Culture Collection	Aerobiosis

Para encontrar el medio más adecuado para cada cepa, se emplearon los medios sugeridos por ATCC: agar soya tripticaseína para *Porphyromonas gingivalis*, infusión cerebro corazón para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y Mueller-Hinton para *Escherichia coli*. Una vez activadas se hizo un stock de cada cepa y fueron almacenados en el REFCO a -70°C hasta su uso.

También se sembraron en varios medios de cultivo sólidos para evaluar su óptimo crecimiento: en agar tripticaseína de soya, agar eosina y azul de metileno (BD 212126) y agar infusión cerebro-corazón. Se realizaron tinciones de Gram para cada cepa.

6.2. Extractos de plantas

Las plantas usadas, la familia a la que pertenecen y los compuestos, se muestran en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Plantas y compuestos antimicrobianos

Nombre común	Nombre científico	Familia	Compuesto
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lamiaceae</i>	Timol Taninos Ácido cafeico
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Asteraceae</i>	Ácido antémico
Caléndula	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Compositae</i>	Carotenos Antocianinas
Cuachalalate	<i>Juliana adstringens Schl.</i>	<i>Julianiaceae</i>	Ácido masticadenoico Triterpenos α -hidroxymasticadienonico
Sangre de Drago	<i>Croton lechleri</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Fenoles, diterpenos Proantocianidinas

En este estudio se usaron extractos comerciales de plantas recolectadas y autenticadas por el Dr. Mauricio González Ferrara.

***Thymus vulgaris* L.** (Tomillo). Lote de producción EFT007034207 y extraído de tallos, hojas y flores por medio de una mezcla hidroalcohólica. Líquido de color ámbar y de olor característico.

Con una densidad de 0.9835, un pH de 5.77 y una cantidad de sólidos totales de 12.70%.

***Matricaria chamomilla* L.** (Manzanilla). Extraído de flores y con el número de lote EFM004093908. El solvente de extracción fue una mezcla hidroalcohólica. Es un líquido de color ámbar y olor característico cuya densidad relativa es de 1.0127. Tiene un pH de 5.52 y una cantidad de sólidos totales de 14.83%.

Croton lechleri (Sangre de Drago). Extraído de la corteza del árbol por medio de una solución hidroalcohólica. Líquido de color café rojizo.

***Calendula officinalis* L.** (Caléndula). Del lote de producción EFM012184008. El material vegetal usado fueron las flores y se usó una mezcla hidroalcohólica para su extracción. No posee conservadores. Tiene las siguientes propiedades organolépticas: líquido, color verde y olor característico. Con una densidad relativa de 0.9989, un pH de 5.85, 6°G.L. de densidad de alcohol y una cantidad de sólidos totales de 12.69% como propiedades fisicoquímicas.

***Juliana adstringens* Schl.** (Cuachalalate). Lote de producción EFC016090808. Extraído de la corteza con el uso de mezclas hidroalcohólicas y sin conservadores. Es un líquido de color vino y olor herbáceo característico. Tiene una densidad de 1.0104, un pH de 6.07, 0°G.L. y un total de 22.41% de sólidos totales.

Los extractos fueron filtrados con filtros de papel de Whatman Ltd. Posteriormente se filtraron nuevamente con filtros Millipore (Durapore® de 0.22 µm GV) y almacenados en frascos ámbar estériles.

6.3. Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos

En un ensayo preliminar se empleó la técnica de pozo en agar para probar si los extractos presentaban actividad antimicrobiana. Se prepararon tubos de ensayo que contenían 5 mL de PBS al 1X. Se tomaron de una a cinco colonias aisladas de las cajas y se colocaron en los tubos. Se comparó turbidez con el estándar de McFarland en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU® 650.

100 µL de inóculo conteniendo 1.5×10^8 UFC/mL fueron colocados en cajas de agar tripticaseína de soya para *P. gingivalis* y *E. coli* y de agar infusión cerebro-corazón para *A. actinomycetemcomitans*. Se distribuyó con una espátula de vidrio y se hicieron los pozos de 10 mm de diámetro (5 pozos por caja). En los pozos se depositaron 100 µL de cada una de las diluciones de los extractos. Se llevaron a incubar siguiendo las recomendaciones para cada cepa (Figura 6.1).

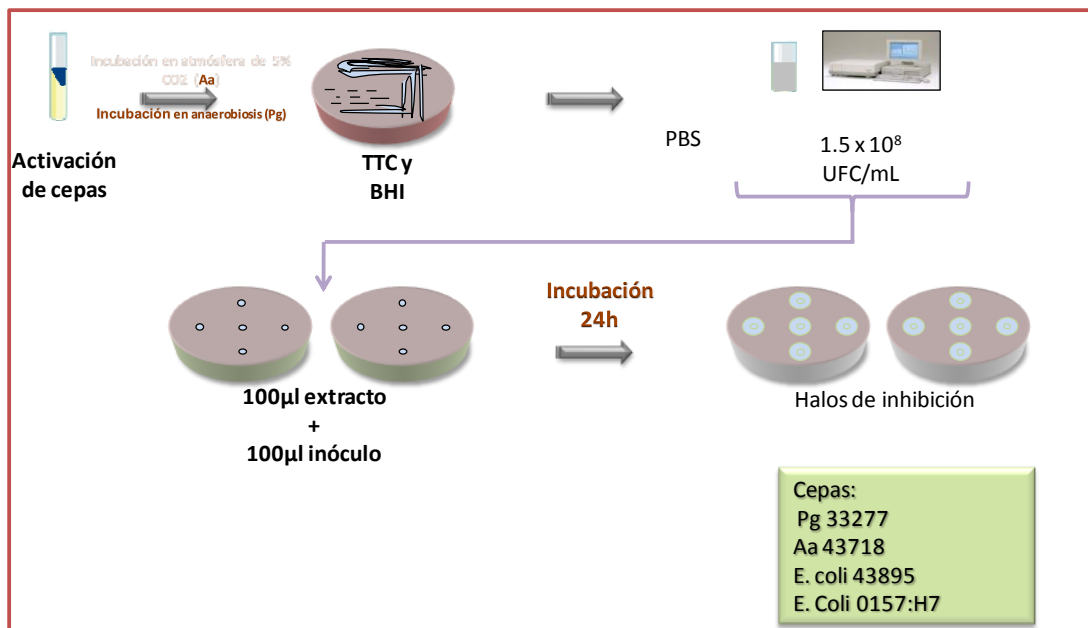


Figura 6.1. Técnica de pozo en agar.

6.3.1. Técnica de microdilución en caldo.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por medio de la técnica de microdilución en caldo. La CMI es la mínima concentración de un antibiótico que inhibe el desarrollo visible de un microorganismo.

Se usaron placas de cultivo de 96 pozos (Costar 3595, Corning Inc.) aprovechando para ensayar hasta 11 diluciones ya que la última columna se usó para los controles de crecimiento bacteriano y de esterilidad del medio (Figura 6.2).

En placas de 96 pozos se hicieron diluciones seriadas 1:2 y 1:3 de cada uno de los extractos (desde 100% hasta 0.4%) con cada uno de los medios de cultivo, según la cepa a probar. Se prepararon tubos con PBS y una suspensión calibrada de microorganismos usando el 0.5 de la Escala Mc Farland que corresponde al 1.5×10^8 UFC/mL. Dicha escala relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato bórico (mezcla de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra.

En la línea A y B se colocó extracto de *T. vulgaris* desde una concentración al 50% en la columna 2 hasta 0.4% en la columna 11. La columna 12 se usó como control:

dos pozos sólo con inóculo y sirven como control de crecimiento, dos pozos con sólo medio para control de esterilidad y dos pozos con clorhexidina como control positivo.

Las líneas C y F se dejaron libres. La línea D y E se puso extracto de *M. chamomilla*, en la línea G y H se puso *J. adstringens*. En una segunda placa se puso extracto de *C. officinalis* en la línea B y C y en la línea F y G extracto de *C. lechleri* (Figura 6.2).

Las placas se incubaron a 35°C por 24h (aeróbica y anaeróticamente, de acuerdo a los requerimientos de cada cepa). Al término del período de incubación, las placas de 96 pozos fueron examinados a simple vista con la finalidad de observar la turbidez que nos indica que el crecimiento bacteriano no ha sido inhibido por la concentración del extracto contenido en el medio. Todos los ensayos se hicieron en doble pozo y por triplicado.

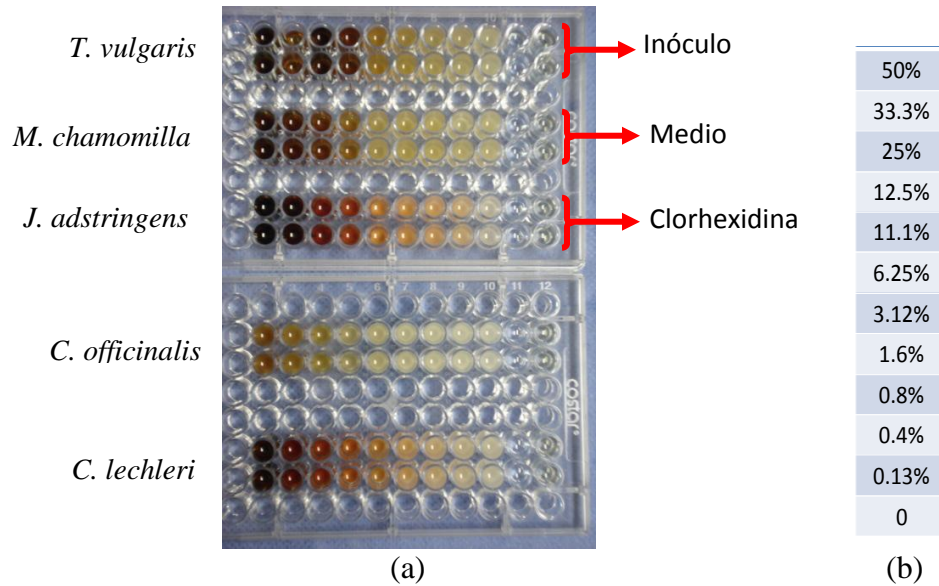


Figura 6.2. (a) Técnica de microdilución en caldo. Se observan los pozos con los cinco diferentes extractos. La columna 12 usada para controles. (b) Concentraciones finales de los extractos.

6.3.2. Técnica de dilución en agar

La concentración mínima bactericida (CMB) se realizó por medio de la técnica de dilución en agar. La CMB es la concentración mínima de un fármaco que extermina al 99.9% del inóculo.

Por medio de la técnica de vaciado en placa, y realizando diluciones 1:10, las muestras provenientes de las placas de 96 pozos se inocularon en cajas de petri, para cuantificar las UFC y determinar la CMB.

Se inocularon placas con 100 μ l del contenido de los pozos donde no había turbidez y del pozo siguiente con menor dilución de extracto cuando el medio de cultivo aun estaba líquido. Se incubaron a 35°C por 24 horas bajo condiciones de anaerobiosis para *P. gingivalis*, de aerobiosis para las cepas de *E. coli* y de 5% de CO₂ para *A. actinomycetemcomitans*. Cada prueba se hizo en duplicado y en tres ensayos independientes.

6.4. Biopolímeros

El quitosan con 75% de desacetilación fue comprado en Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis Missouri, US). El pululano que se empleó tiene un peso molecular de 200 kD y características de pureza del 90%; fue donado por Hayashibara, Company (Okayama, Japon).

Se evaluó la actividad antimicrobiana en los cultivos de las cepas mencionadas así como su vida útil por un período de almacenamiento de 3 meses consecutivos, evaluando su actividad cada mes bajo diferentes condiciones de temperatura, humedad relativa e iluminación.

6.4.1. Elaboración de las películas de quitosan y pululano

Se emplearon 3 diferentes formulaciones para cada biopolímero para encontrar aquella que tuviera las propiedades adecuadas para este estudio.

Para preparar las películas de quitosan, se mezclaron, bajo agitación, 1.0, 1.2 y 0.8 g de quitosan en polvo en 100 mL de una solución acuosa de ácido acético al 1% (vol/vol). La formulación al 0.8% fue adicionada con glicerol al 0.2% (como plastificante).

Se probaron tres diferentes concentraciones para las películas de pululano: al 10%, 12% y otra al 10% con D-sorbitol al 0.3%, como plastificante.

Los extractos de plantas y los polímeros se mezclaron en vasos de precipitado bajo agitación con magneto, en placas de agitación (Thermolyne. Cimarec®2), hasta lograr que la mezcla se volviera homogénea (Figura 6.3).

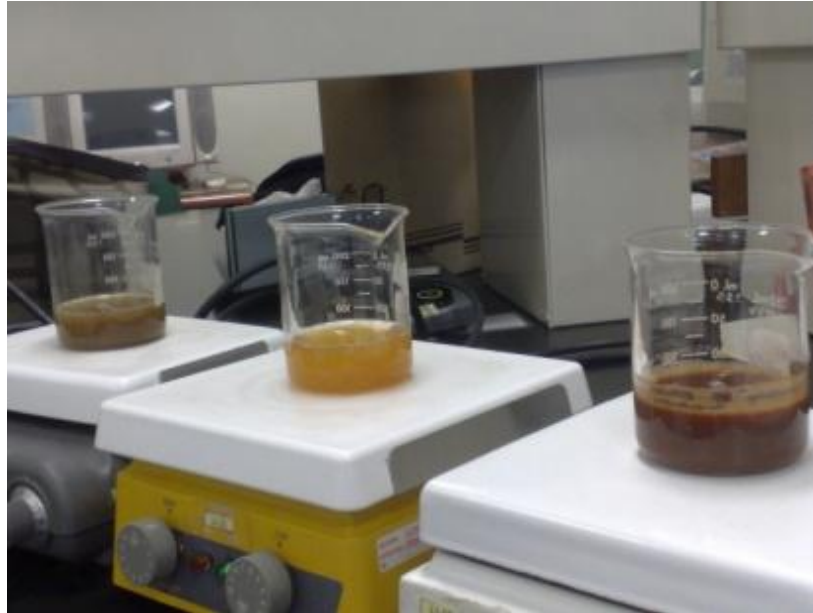


Figura 6.3. Preparación de los formulados de polímeros con los extractos de plantas.

Se determinó el pH de cada una de las mezclas de biopolímeros con un potenciómetro (Beckman). Las mediciones se realizaron por triplicado para cada formulación (Figura 6.4).

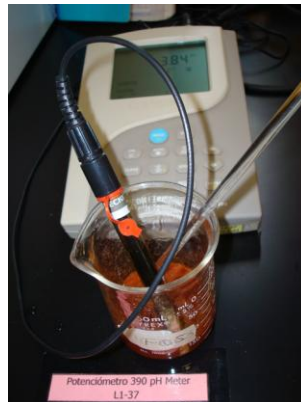
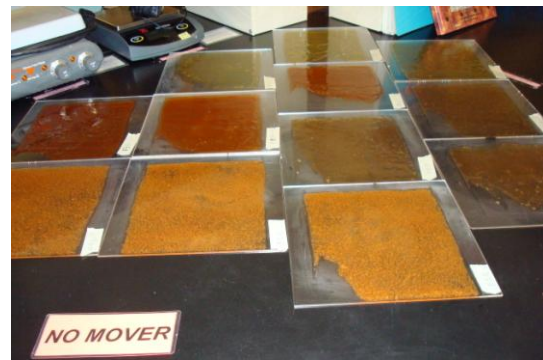


Figura 6.4. Medición del pH de la mezcla de polímero y extracto.

Una vez preparada la formulación se procedió a verterla en diferentes moldes de acrílico. El método utilizado fue el de “casting”. Usando una cuchilla de extensión se distribuyó en el molde y se dejó ahí para su curado o secado (Figura 6.5).



(a)



(b)

Figura 6.5. (a) Mezcla de quitosán con extracto de *J. adstringens* siendo distribuida en las placas molde. (b) Secado de las mezclas de polímeros con los diferentes extractos.

Se dejaron secar a temperatura ambiente y se recuperaron las películas manualmente a las 24 horas (Figura 6.6).

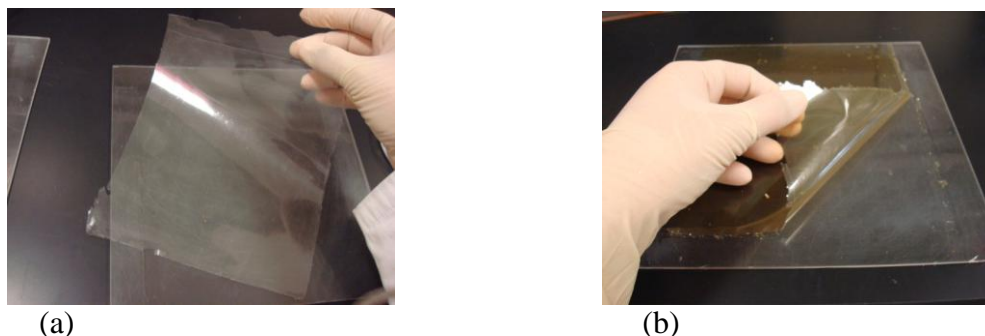


Figura 6.6. Películas de biopolímeros siendo separadas de las placas después de su secado. (a) quitosan, (b) pululano.

Las películas fueron recortadas con un perforador de 6 mm de diámetro y almacenadas en cajas de Petri previamente identificadas (Figura 6.7). Se midió el grosor de las películas con un micrómetro (Mitutoyo.Digimatic 1”).

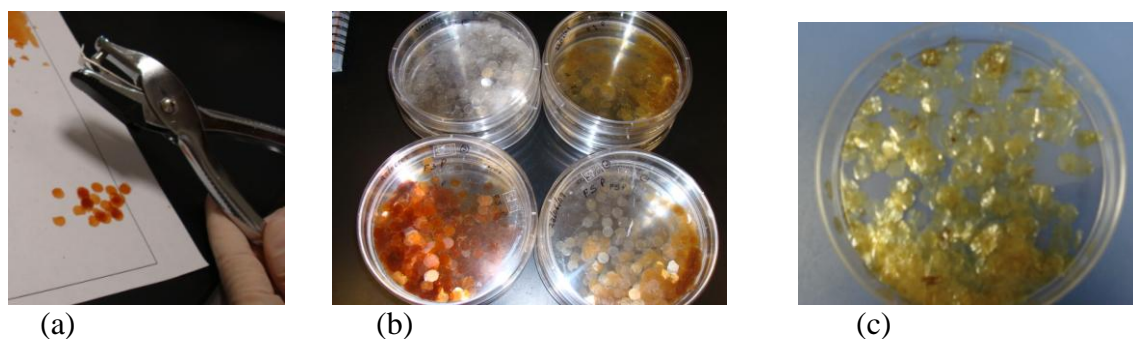


Figura 6.7. Recorte y almacenamiento de los discos de polímeros. (a) perforador de papel; (b) cajas de Petri con cada uno de los diferentes polímeros; (c) aspecto de los discos de quitosan con extracto de *T. vulgaris*.

6.5. Evaluación de las propiedades antimicrobianas de las películas adicionadas con los extractos.

Se evaluó, mensualmente, la actividad antimicrobiana en los cultivos de las cepas mencionadas por un período de 3 meses consecutivos, evaluando la actividad de las películas almacenadas bajo diferentes condiciones de temperatura (25°C y 4°C), humedad relativa (60% y 25%) e iluminación (luz y oscuridad).

La evaluación se llevó a cabo por medio de pruebas de sensibilidad de discos por difusión en agar. Se siguió el método descrito por Bauer *et al* depositando 0.1mL de inóculo en cajas de Petri de 90 mm que contenían el medio de cultivo específico para cada cepa. Se dispersaba el inóculo para cubrir toda la placa.

Los discos de biopolímeros fueron esterilizados por medio de luz ultravioleta (UV) durante 45 min. previos a cada prueba.

Posteriormente, los discos de quitosan y pululano, sin extracto y adicionados con los diferentes extractos, fueron depositados simétricamente con la ayuda de unas pinzas de curación estériles. Se colocaron 5 discos por caja (Figura 6.8). Todos los ensayos se hicieron dos veces y en tres experimentos por separado.

Las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C. Transcurrido el período de incubación indicado, se procedía a la observación y medición del halo de inhibición de crecimiento que se expresa aplicando la fórmula:

$$\text{Valor de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición} - \text{diámetro del disco (6mm)}}{2}$$

Todos los ensayos se hicieron dos veces y en tres experimentos por separado.

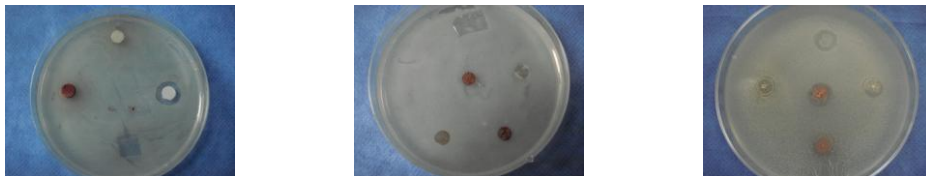


Figura 6.8. Técnica de sensibilidad por difusión de disco en agar.

6.6. Determinación de la vida útil de las películas de biopolímeros con los extractos

Los discos de biopelículas fueron almacenadas en placas de 24 pozos para cultivo celular previamente identificadas (Figura 6.9), bajo diferentes condiciones de iluminación (luz y oscuridad), temperatura (25°C y 4°C) y humedad relativa (60% y 25%).

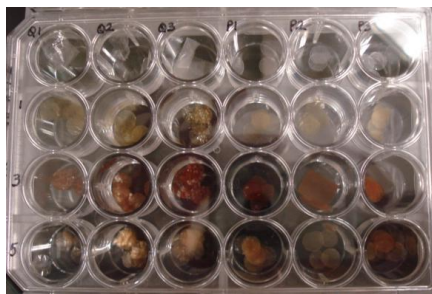


Figura 6.9. Placa de 24 pozos conteniendo los discos de los diferentes polímeros con los extractos de plantas.

En un desecador de vidrio Pyrex se agregó nitrato de magnesio para mantener la humedad. Se almacenaron dos placas de cultivo de 24 pozos conteniendo los discos de biopolímeros a una temperatura de 25°C y 60% HR. Una de las placas fue forrada con papel aluminio para impedir la penetración de luz, la otra se dejó descubierta (Figura 6.10). Otra caja se almacenó a 4°C.



Figura 6.10. Discos de polímeros almacenados en el desecador a una HR del 60%, con y sin luz.

Otras dos placas conteniendo los diferentes discos de polímeros se colocaron en una cabina de desecación Dry Keeper, SANPLATEC, Corp. a una temperatura de 25°C y 25% HR. Para el control de luz, una placa fue cubierta en su totalidad por papel aluminio y la otra se dejó descubierta (Figura 6.11).

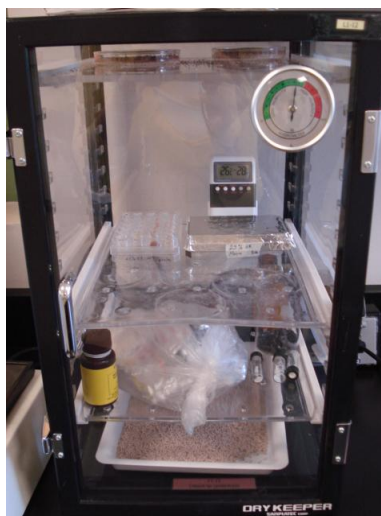


Figura 6.11. Discos de polímeros almacenados a 25% de HR, con y sin luz.

La actividad antimicrobiana se evaluó mensualmente por medio de la prueba de difusión en agar, cada mes, durante los tres meses subsecuentes a su elaboración. Todas las pruebas se realizaron en doble caja y en tres ensayos independientes.

6.7. Pruebas de solubilidad

Para conocer el comportamiento de las películas en saliva, se colocaron discos de polímeros de las diferentes condiciones de almacenamiento, en vidrios de reloj conteniendo 3 mL de saliva artificial (Saliva substitute. Roxane Laboratories. Boehringer Ingelheim. Columbus, Ohio) y se cronometró el tiempo de dilución de cada una de ellas.

6.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.- Para evaluar las propiedades antimicrobianas (CMI y CMB) de los extractos se utilizó un diseño bifactorial con 3 repeticiones, y los datos se analizaron por medio de un ANOVA de 2 factores y 3 repeticiones.

2.- Para las propiedades antimicrobianas de las películas se hizo un diseño de 3 factores (polímeros, extractos y cepas) con 3 repeticiones y los datos se evaluaron por medio de una prueba de ANOVA de 3 factores con 3 repeticiones.

3.- Para la evaluación de la vida útil de las películas se hizo un diseño de parcelas divididas donde los factores evaluados fueron:

Factor A: Humedad, con 2 niveles.

Factor B: Temperatura, con 2 niveles.

Factor C: Luz, con 2 niveles.

Bloques: Fueron tres (los meses que se hicieron las mediciones). El análisis estadístico fue por medio de ANOVA de 3 factores para parcelas divididas.

4.- Para la determinación de los niveles de homogeneidad se usó la prueba de Tukey.

Para el análisis estadístico de cada ensayo se empleó el programa estadístico SPSS (Statistical Program for Social Sciences) versión 17.0.

7. RESULTADOS

7.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Cuatro cepas fueron analizadas en este trabajo: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718, *Escherichia coli* ATCC 43895 y *Escherichia coli* 0157:H7 (como cepas control). La identificación se confirmó por medio de tinción de Gram.

Con el propósito de seleccionar el mejor medio de cultivo para cada microorganismo, se realizaron ensayos preliminares en caldo de tripticaseína de soya, infusión cerebro corazón, en caldo Mueller-Hinton y en caldo Mueller-Hinton adicionado con extracto de levadura.

Porphyromonas gingivalis. Este microorganismo tuvo mejor crecimiento en caldo de tripticaseína de soya.

Las cepas de *E. coli* tuvieron buen crecimiento en todos los medios empleados pero se decidió utilizar el mismo que para *P. gingivalis*.

Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* fueron los microorganismos más difíciles para activar ya que sólo crecieron en caldo de infusión cerebro-corazón pero no en los otros medios, por lo que se decidió usar este medio de cultivo en todo el trabajo.

El mejor medio sólido para *P. gingivalis* fue el agar tripticaseína de soya al igual que para las cepas de *E. coli*. *A. actinomycetemcomitans* sólo creció en agar infusión cerebro-corazón.

7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

En un ensayo preliminar se empleó la técnica de pozo en agar para probar si los extractos presentaban actividad antimicrobiana.

Todos los extractos mostraron algún grado de actividad inhibitoria contra las cuatro cepas empleadas en este trabajo. Los halos de inhibición se pueden observar en la Figura 7.1.

Una vez que se confirmaron las propiedades antimicrobianas de los extractos, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida.

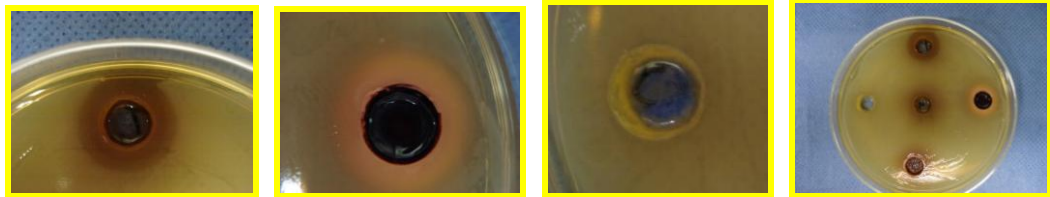


Figura 7.1. Zonas de inhibición de crecimiento microbiano.

7.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI se determinó por medio de la técnica de microdilución en caldo. De acuerdo a los resultados de las pruebas, el análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre los extractos ($p < 0.05$).

El extracto de *J. adstringens* y *C. lechleri* exhibieron la más baja CMI (37mg/mL) contra cepas de *P. gingivalis* y *E. coli* 43895 y contra *A. actinomycetemcomitans* y *E. coli* 43895 respectivamente. La CMI más alta fue para el extracto de *C. officinalis* contra *A. actinomycetemcomitans* (250 mg/mL). El extracto de *J. adstringens* contra *P. gingivalis* y *C. lechleri* sobre *A. actinomycetemcomitans* mostraron la CMB más baja (37 mg/mL) mientras que *C. officinalis* requirió de concentraciones más elevadas (330 mg/mL) para lograr alcanzar la CMB contra ambas cepas de *E. coli* probadas (Tabla 7.1).

Tabla 7.2. CMI y CMB de los extractos de plantas sobre las cepas probadas

PLANTAS (mg/mL)	<i>T. vulgaris</i>		<i>M. chamom.</i>		<i>J. adstring.</i>		<i>C. offic.</i>		<i>C. lechleri</i>		Clorhexidina	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
CEPAS												
<i>Aa</i>	63	111	63	250	63	63	250**	250	37*	37*	0.12	0.12
<i>Pg</i>	63	63	63	250	37*	37*	63	250	111	111	0.12	0.12
<i>E. coli</i> 895	63	63	111	250	37*	63	63	330**	37*	111	0.12	0.12
<i>E. coli</i> H7	63	111	125	250	63	111	125	330**	63	111	0.12	0.12

CMI más baja * y más elevada ** CMB más baja * y la más elevada ** de todos los extractos empleados.

El extracto de *T. vulgaris* mostró una actividad muy uniforme sobre cada una de las cepas con una CMI de 63 mg/mL y una CMB igual para las cepas de *P. gingivalis* y *E. coli* 43895 y de 111 mg/mL para las cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *E. coli* H7. *M. chamomilla* requirió concentraciones de 63 mg/mL para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, de 111 mg/mL y de 125 mg/mL para las cepas de *E. coli* H7 y de 250 mg/mL para alcanzar la CMB para todas las cepas. *J. adstringens* tuvo una CMI de 63 mg/mL para las cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *E. coli* H7 y también una CMB de 63 mg/mL para *A. actinomycetemcomitans* y *E. coli* 43895 y de 111 mg/mL para *E. coli* H7.

Finalmente, para *C. officinalis* 63 mg/mL fue la CMI sobre *P. gingivalis* y *E. coli* 43895 y de 125 mg/mL sobre *E. coli* H7. *C. lechleri* presentó una CMI de 63 mg/mL para *E. coli* H7 y de 111 mg/mL para *P. gingivalis* y para ambas cepas de *E. coli*. La clorhexidina usada como control positivo fue eficiente en la concentración comúnmente empleada en los enjuagatorios disponibles comercialmente (0.12%).

Los resultados de las medias y sus desviaciones estándar se muestran en la Figura 7.2.

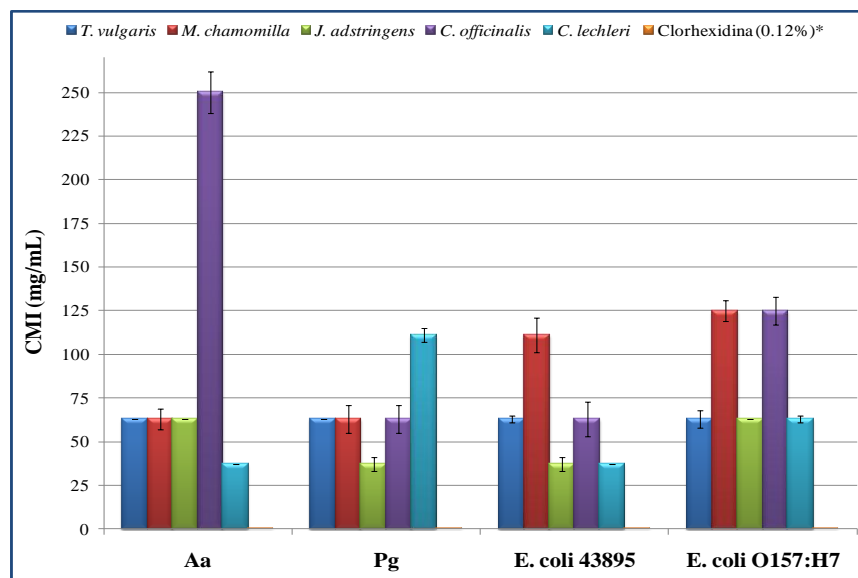


Figura 7.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las diferentes plantas sobre los microorganismos probados. Clorhexidina al 0.12%, usada como control positivo. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres ensayos realizados en duplicado y totalmente independientes.

7.2.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La concentración mínima bactericida (CMB) se realizó por medio de la técnica de dilución en agar.

La CMB más baja de estos ensayos fue para el extracto de *J. adstringens* para las cepas de *P. gingivalis*. Por otro lado la CMB más elevada fue para el extracto de *C. officinalis* para *E. coli* O157:H7.

El análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre los diferentes extractos ($p \leq 0.0000$). Los resultados se muestran en la Figura 7.3.

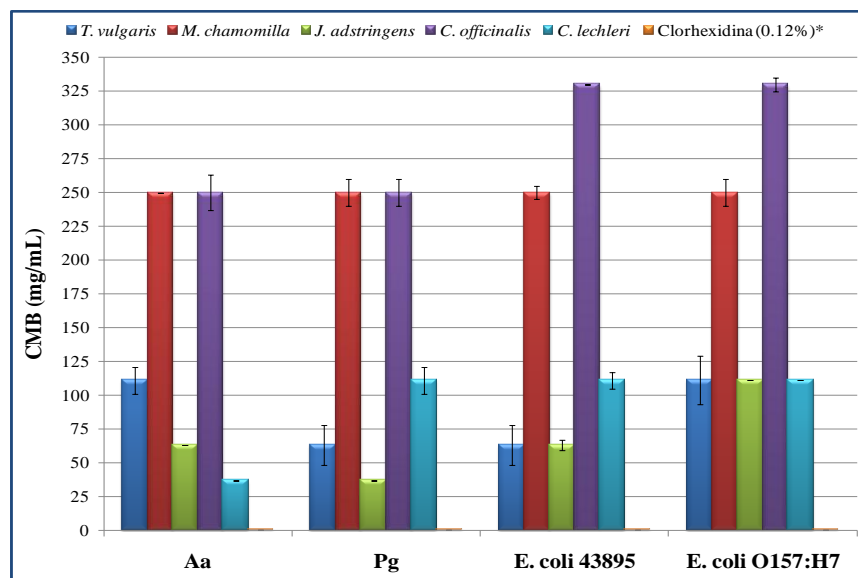


Figura 7.3. Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos de las diferentes plantas sobre los microorganismos probados. Clorhexidina al 0.12%, usada como control positivo. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres ensayos realizados en duplicado y totalmente independientes.

7.3. Elaboración de las películas de biopolímeros

Se eligieron los extractos que presentaron la mejor concentración mínima bactericida: *T. vulgaris*, *J. adstringens* y *C. lechleri* y fueron los que se usaron con los biopolímeros para la elaboración las películas.

De las tres formulaciones de cada polímero se eligió aquella que mostraba mejores características físicas para ser usadas en el presente trabajo.

Para las películas de quitosan, la concentración al 1% resultó apropiada para ser mezclada con los extractos de *T. vulgaris* y *C. lechleri*.

Las películas de quitosan y *J. adstringens* no pudieron ser recuperadas debido a que quedaron adheridas a las placas de acrílico y se rompían al intentar despegarlas por lo que se probaron otras formulaciones de quitosan.

De las nuevas formulaciones que se probaron para la elaboración de películas de quitosan con *J. adstringens*, la de quitosan al 0.8% y adicionando glicerol al 0.2%, se tuvieron mejores resultados, obteniendo películas más flexibles y fácilmente desprendibles de las placas molde.

Con las tres formulaciones de pululano probadas, se obtuvieron películas con buenas características, sin embargo se decidió optar por la formulación al 10% con D-sorbitol al 0.3% porque este elemento le dio más plasticidad.

Las mezclas de quitosan y de pululano con y sin extractos de plantas fueron colocadas en una placa de agitación con una barra magnética hasta homogeneizar y se midió el pH con un potenciómetro (Beckman). Las medias y desviaciones estándar del pH de todas las formulaciones pueden ser observadas en la Tabla 7.2. Las pruebas se realizaron por triplicado (Figura 7.4). El pH promedio fue de 3.9 para las formulaciones de quitosan y de 5.7 para las de pululano.

Tabla 7.3. Medias y desviaciones estándar del pH de las formulaciones.

Polímeros	Media \pm s
Quitosan	3.53 \pm 0.17
Quitosan- <i>T.vulgaris</i>	3.94 \pm 0.04
Quitosan- <i>J. adstringens</i>	3.84 \pm 0.03
Quitosan- <i>C. lechleri</i>	4.00 \pm 0.14
Pululano	5.39 \pm 0.21
Pululano- <i>T. vulgaris</i>	5.24 \pm 0.08
Pululano- <i>J. adstringens</i>	5.34 \pm 0.13
Pululano- <i>C. lechleri</i>	6.63 \pm 0.05

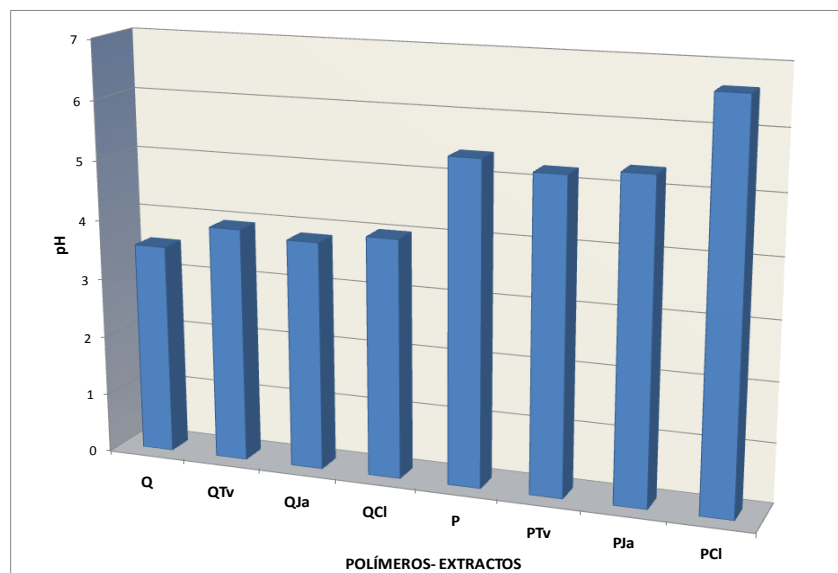


Figura 7.4. Resultados del pH de las diferentes formulaciones de polímeros adicionados con los extractos de plantas. **Q**, quitosan; **QTv**, quitosan- *T. vulgaris*; **QJa**, quitosan- *J. adstringens*; **QCl**, quitosan- *C. lechleri*; **P**, pululano; **PTv**, pululano-*T. vulgaris*; **PJa**, pululano-*J. adstringens*; **PCl**, pululano- *C. lechleri*.

7.3.2. Grosor de las películas

Se midió el grosor de los discos de polímero con el micrómetro y se realizaron las pruebas estadísticas. Las películas de quitosan tuvieron un grosor promedio de 0.03 mm mientras que las de pululano fue de 0.072 mm.

Hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las películas elaboradas de quitosan sin extracto (Q), quitosan con *T. vulgaris* (QTv) y quitosan con *C. lechleri* (QCl) comparadas con las de quitosan *J. adstringens* (QJa). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos del grosor de las películas elaboradas con pululano para las diferentes formulaciones.

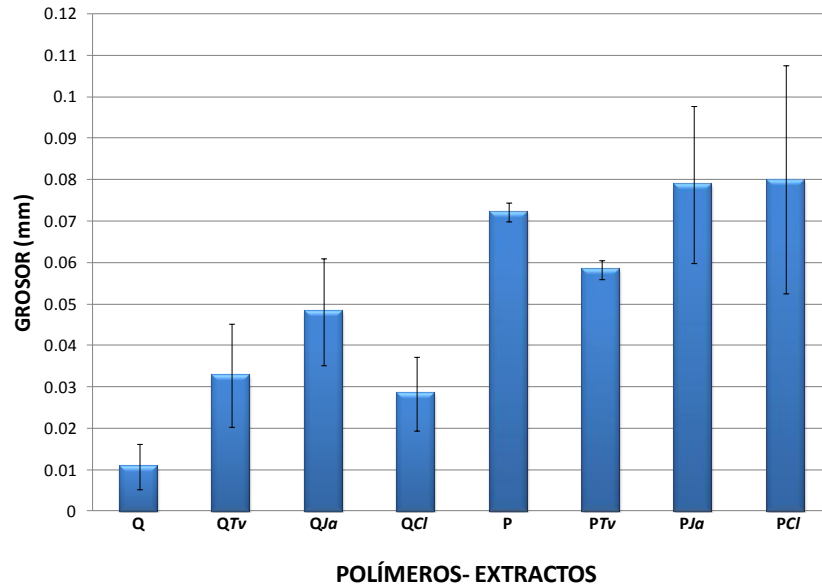


Figura 7.5. Resultados del grosor de las películas de polímeros. **Q**, quitosan; **QTv**, quitosan- *T. vulgaris*; **QJa**, quitosan- *J. adstringens*; **QCl**, quitosan- *C. lechleri*; **P**, pululano; **PTv**, pululano-*T. vulgaris*; **PJa**, pululano-*J. adstringens*; **PCl**, pululano-*C. lechleri*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres ensayos realizados en duplicado y totalmente independientes.

7.3.3. Resultados de las pruebas de solubilidad

Las figuras 7.6 y 7.7 muestran la conducta de disolución de las películas de biopolímeros en saliva artificial, en función de tiempo y a un pH de 7. Todos los discos de pululano se disolvieron dentro de los primeros 3 min. Las películas de pululano con *C. lechleri* (PCl) almacenadas bajo una HR de 25% y sin luz y las de pululano con *J. adstringens* (PJa) almacenadas a la misma humedad pero con luz fueron las que se disolvieron más rápido. Las de quitosan adicionadas con *C. lechleri* (QCl) almacenadas al 60% de HR y sin luz fueron las que más tardaron en disolverse. Las películas de quitosan sin extracto (Q) y de quitosan con *J. adstringens* (QJa) no se disolvieron a pesar de que permanecieron 24 horas inmersas en la saliva.

Los grupos de homogeneidad derivados de la prueba de Tukey mostró que hubo tres grupos principales en la solubilidad de los polímeros almacenados a un 60% de HR: el grupo 1 están casi todas las películas a excepción de pululano sin extracto (P) almacenado bajo condiciones de luz que pertenece al grupo 2 junto con quitosan- *T. vulgaris* (QTv). Quitosan- *C. lechleri* (QCl) pertenece al grupo 3 (Figura 7.6). Los grupos

de homogeneidad formados con los polímeros almacenados a un 25% de HR son: grupo 1, por pululano (P), pululano- *T. vulgaris* (PTv), pululano- *J. adstringens* (PJa), pululano- *C. lechleri* (PCI) y quitosan- (QCI) y grupo 2, constituido por quitosan (Q) (Figura 7.7).

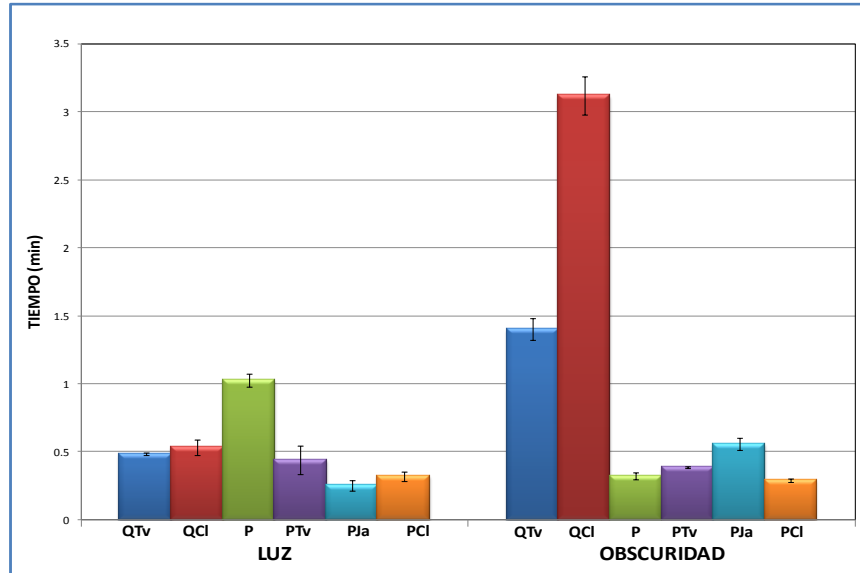


Figura 7.6. Tiempo de solubilidad de las películas de biopolímeros almacenadas a una humedad relativa del 60%, con y sin luz. Letras minúsculas diferentes representan valores significativamente diferentes $p \leq 0.05$

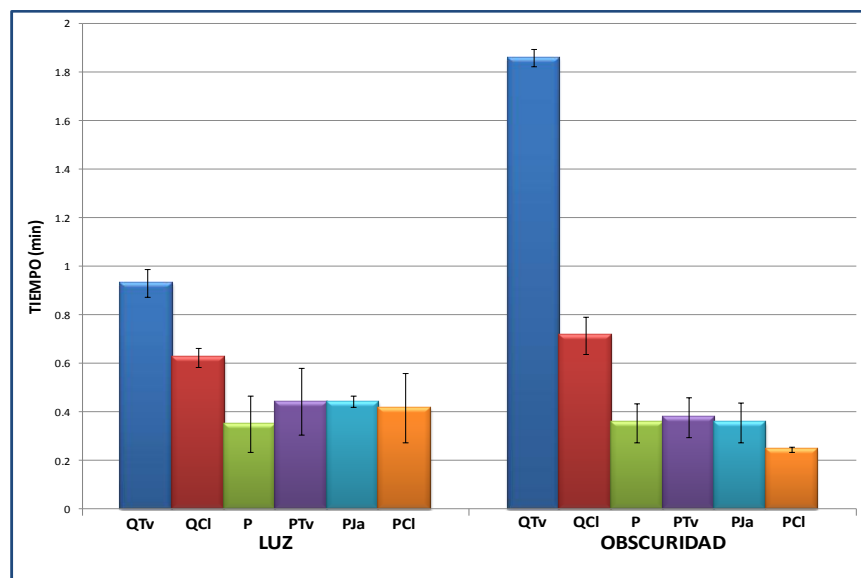


Figura 7.7. Tiempo de solubilidad de las películas de biopolímeros almacenadas a una humedad relativa del 25%, con y sin luz. Letras minúsculas diferentes representan valores significativamente diferentes $p \leq 0.05$.

7.4. Evaluación el efecto antimicrobiano de las películas de biopolímeros

La actividad antimicrobiana de los discos de biopolímeros se determinó por medio de la prueba de difusión en agar. Los discos fueron esterilizados con UV durante 45 min. previos a cada prueba.

En general, todas las películas elaboradas con pululano mostraron una mejor actividad que las de películas de quitosan. Aún cuando las películas de pululano sin extracto tuvieron buena actividad, las que fueron adicionadas con los extractos de plantas aumentaron su potencial de inhibición.

7.4.1. Actividad antimicrobiana de los biopolímeros sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Las películas elaboradas con pululano adicionadas con extracto de *T. vulgaris* presentaron la mejor inhibición de crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*. Los halos de inhibición fueron de un promedio de 15.7 mm. Las de pululano sin extracto produjeron un halo de 15.3 mm; una zona de inhibición de 13.3 mm para las películas de

pululano con *J. adstringens* y de 13 mm tanto para las de pululano como las de quitosan adicionadas con extracto de *C. lechleri*. *A. actinomycetemcomitans* tuvo halos de inhibición de 10.7 mm, 10.3 mm y 10 mm con las películas de quitosan sin extracto, quitosan con *J. adstringens* y *T. vulgaris* respectivamente (Figura 7.8).

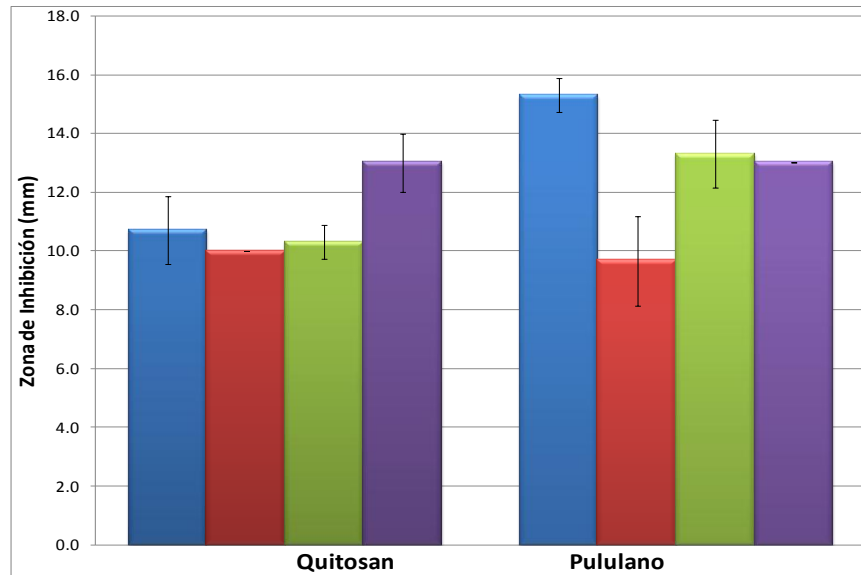


Figura 7.8. Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de *A. actinomycetemcomitans*. ■ Sin extracto, ■ *T. vulgaris*, ■ *J. adstringens*, ■ *C. lechleri*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

7.4.2. Actividad antimicrobiana de los biopolímeros sobre *Porphyromonas gingivalis*

La mejor actividad fue para las películas de pululano con extracto de *T. vulgaris* y *C. lechleri* (11.3 mm) y de pululano con *J. adstringens* (10.7 mm). Las otras películas mostraron resultados muy similares: 10.3 mm para quitosan con *C. lechleri*, 10.0 mm para quitosan y pululano sin extracto, 9.7 mm las de quitosan con *J. adstringens* seguida de quitosan con *T. vulgaris* (9.0 mm). Los resultados se muestran en la Figura 7.9.

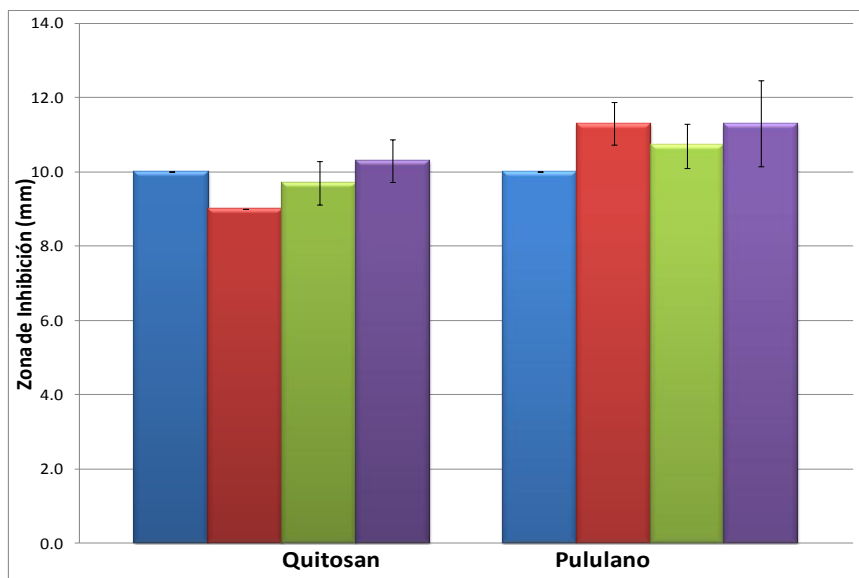


Figura 7.9. Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de *P. gingivalis*. ■ Sin extracto, ■ *T. vulgaris*, ■ *J. adstringens*, ■ *C. lechleri*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

7.4.3. Actividad antimicrobiana de los biopolímeros sobre *E. coli* 43895

En el caso de la actividad inhibitoria de crecimiento de *E. coli* 43895, se observó que la mejor actividad fue para las películas de pululano con *J. adstringens* y *C. lechleri* (13 mm). Las películas de pululano sin extracto y pululano con *T. vulgaris* exhibieron un halo de inhibición de 9.7 mm, seguidas por las de quitosan sin extracto y quitosan con *C. lechleri* (6 mm), mientras que las de quitosan con *J. adstringens* y *T. vulgaris* fueron de 5.3 mm y 5.0 mm respectivamente (Figura 7.10).

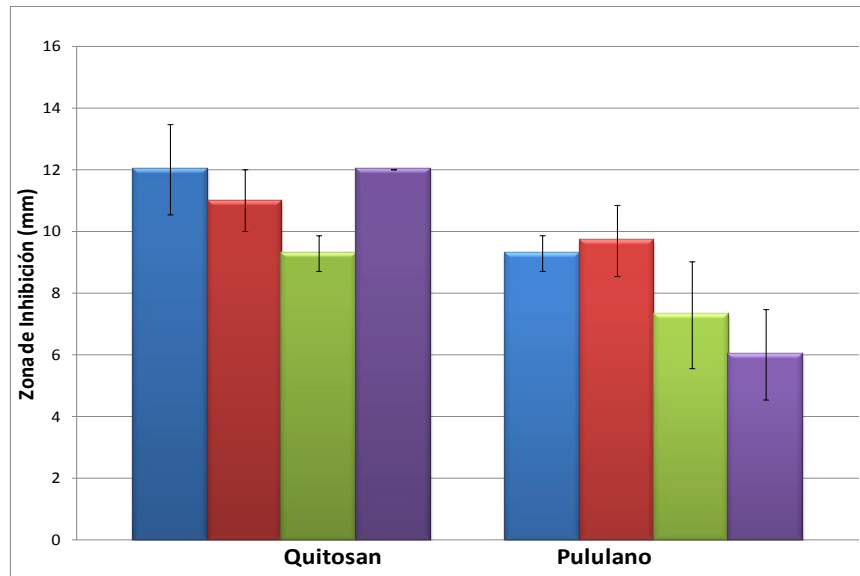


Figura 7.10. Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de *E. coli* 43895. ■ Sin extracto, ■ *T. vulgaris*, ■ *J. adstringens*, ■ *C. lechleri*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

7.4.4. Actividad antimicrobiana de los biopolímeros sobre *E. coli* 0157:H7

En el caso de esta cepa, la mejor actividad fue para las películas de pululano adicionadas con extracto de *C. lechleri* con un diámetro de inhibición de 15.7 mm, seguidas por las películas de pululano con *J. adstringens* (14.7 mm). El pululano sin extracto y el pululano con *T. vulgaris* presentaron zonas de inhibición de crecimiento de 14.3 mm y 13.7 mm respectivamente. El comportamiento de las películas de quitosan fue de 11.3 mm para *C. lechleri*, 10.7 mm para *J. adstringens* y 10 mm para *T. vulgaris* y quitosan sin extracto (Figura 7.11).

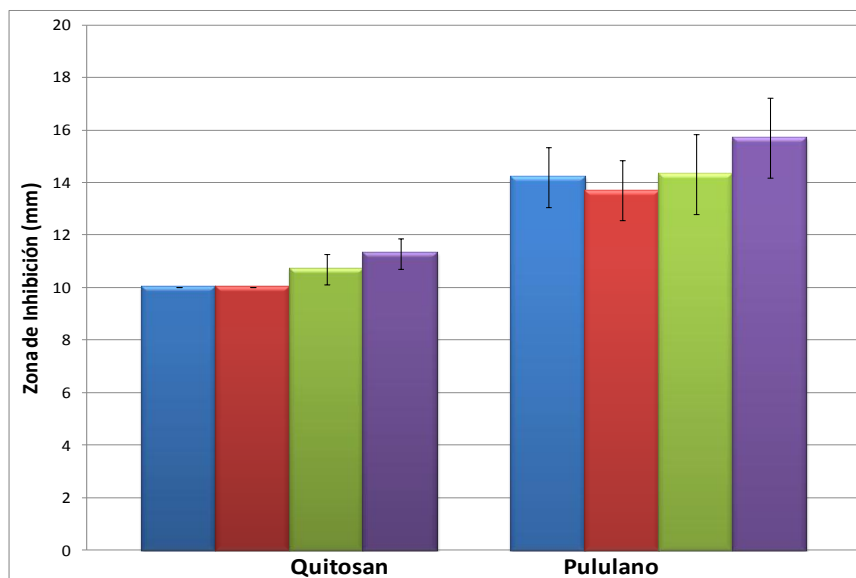


Figura 7.11. Actividad antimicrobiana de las películas con extractos de plantas sobre cepas de *E. coli* 0157:H7. ■ Sin extracto, ■ *T. vulgaris*, ■ *J. adstringens*, ■ *C. lechleri*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

7.5. Determinación de la vida útil de las películas

La vida útil se determinó considerando la actividad antimicrobiana de las películas bajo las tres condiciones de almacenamiento: humedad relativa, temperatura e iluminación, realizando las pruebas respectivas cada mes por los tres meses subsecuentes a la elaboración de las diferentes películas.

7.5.1. Humedad relativa

7.5.1.1. Efecto de la humedad relativa sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *A. actinomycetemcomitans*

Se evaluó el comportamiento de las películas almacenadas al 60% y 25% de humedad relativa.

Como puede observarse en las Figuras 7.12 y 7.13, la actividad antimicrobiana decreció conforme pasaron los meses, independientemente de las condiciones de almacenamiento.

El análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre las diferentes películas con extractos ($p \leq 0.0000$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas en las dos condiciones de humedad relativa ($p > 0.533$). Al comparar todos los tratamientos mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que, en el primer mes, las películas almacenadas a una humedad relativa del 60%, presentó 4 grupos de homogeneidad. Los grupos de homogeneidad formados son: grupo 1, QTv, y QJa; Q pertenece tanto al grupo 1 como al grupo 2; QCl y PCl son tanto del grupo 2 como del 3; PJa pertenece al grupo 3; P y PTV son del grupo 4 (Figura 7.12). Para las películas almacenadas a una HR del 25%, se formaron 3 grupos de homogeneidad: el grupo 1 constituido por Q, QTV, QJa, QCl; el 2 por PJa y PCl; el 3 por P y PTV (Figura 7.13).

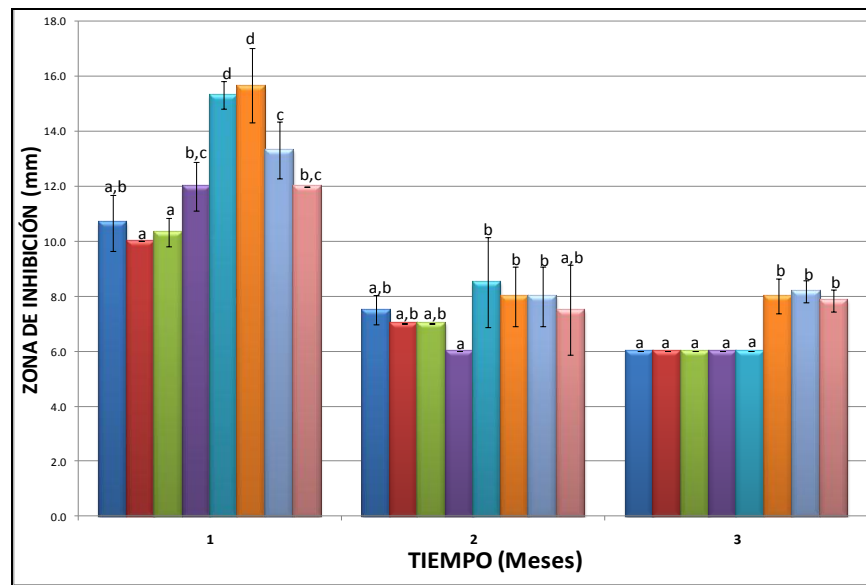


Figura 7.12. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 60% de humedad relativa sobre *A. actinomycetemcomitans* durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTV, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTV, ■ PJa, ■ PCl. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

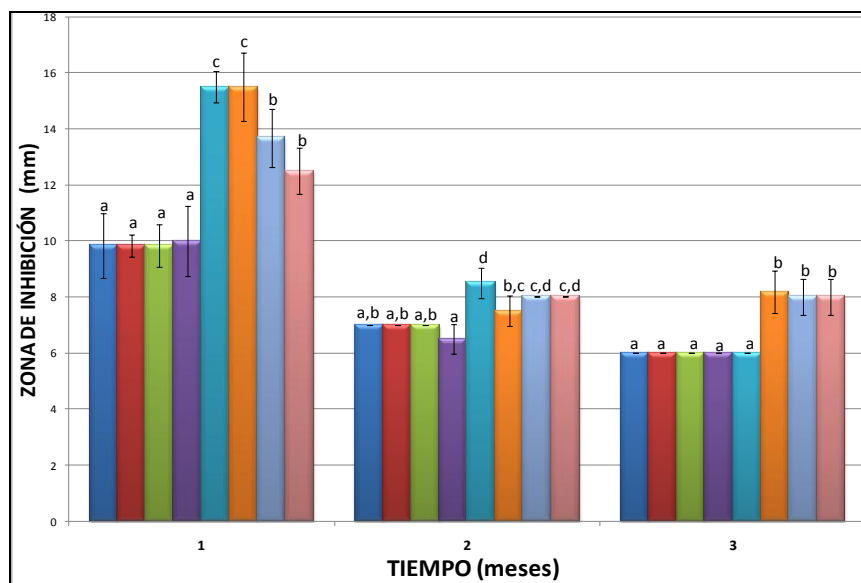


Figura 7.13. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 25% de humedad relativa sobre *A. actinomycetemcomitans* durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTv, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTv, ■ PJa, ■ PCl. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.1.2. Efecto de la humedad relativa sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *P. gingivalis*

Todas las películas probadas mostraron actividad antimicrobiana contra *Pg*, sin embargo fue más marcada en el caso de pululano-*T. vulgaris* (PTv) almacenadas al 60% y 25% de HR en el primer mes de su elaboración. En el segundo mes, las películas de pululano (P) sin extracto fueron las que dieron una mejor actividad. Como puede apreciarse en la Figura 7.14 y 7.15, la actividad antimicrobiana decreció conforme pasaron los meses.

El análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre las diferentes películas ($p \leq 0.0000$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas bajo las dos condiciones de humedad relativa ($p > 0.114$). Al comparar todos los tratamientos de las películas almacenadas al 60% de humedad relativa mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen 3 grupos de

homogeneidad en los primeros tres meses. El grupo 1 constituido por Q y QTv; el grupo 2 por QJa, QCl, P y el 3 formado por PTv, PCl y PJa. En el tercer mes las películas tuvieron un comportamiento más uniforme y sólo se formaron dos grupos de homogeneidad. Las películas almacenadas a 25% de HR tuvieron un comportamiento más homogéneo.

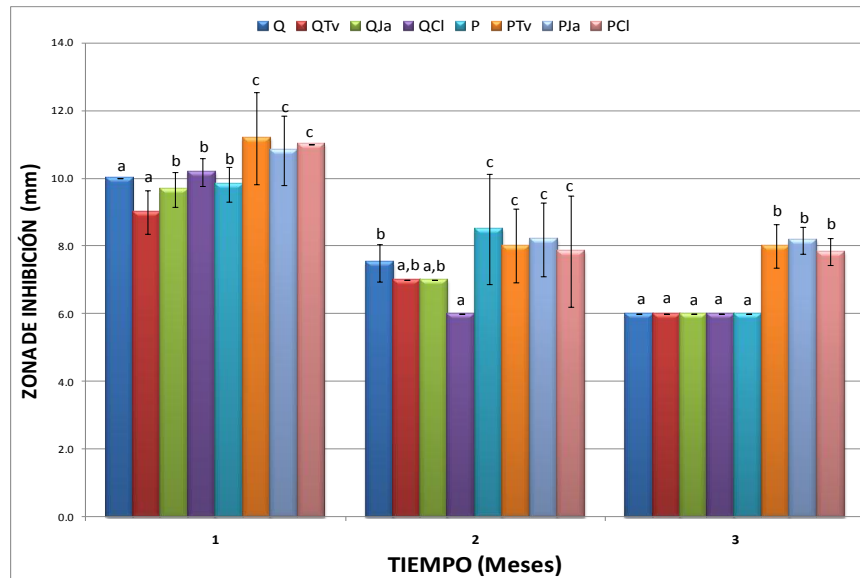


Figura 7.14. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 60% de humedad relativa sobre *P. gingivalis* durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTv, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTv, ■ PJa, ■ PCl. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

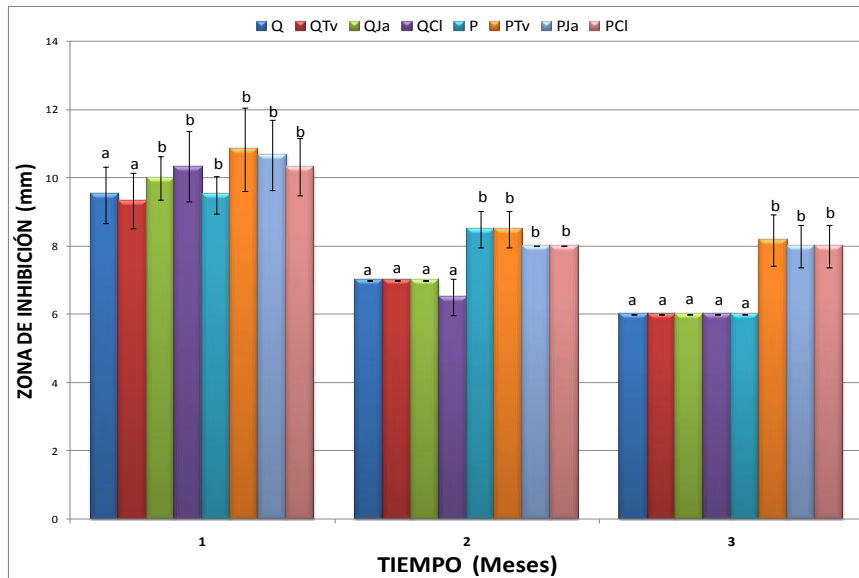


Figura 7.15. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 25% de humedad relativa sobre *P. gingivalis* durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTV, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTV, ■ PJa, ■ PCI. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.1.3. Efecto de la humedad relativa sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *E. coli* 43895

En el caso de la actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una HR del 60% y 25% sobre *E. coli* 43895, en el primer mes de almacenamiento, las películas de PCI fueron las que mostraron mejor actividad inhibitoria. El resto fue en el siguiente orden decreciente: PJa > Ptv > P > QCl > QJa > Q > QTV. Las películas de Q sin extracto fueron las de más baja actividad durante todo el experimento (Figura 7.16 y 7.17). La actividad antimicrobiana de todos los polímeros disminuyó conforme transcurrió el tiempo, sobretodo para las películas de pululano.

El análisis de varianza no mostró diferencia significativa entre las películas con extractos ($p > 0.102$), ni entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas en las dos condiciones de humedades relativa ($p > 0.635$).

Con los resultados de la prueba de Tukey determinó que, el primer mes, existen 3 grupos de homogeneidad: en el 1 están Q, QTV, QJa y QCl; en el dos, P y PTV; y en el grupo tres, PJa y PCI.

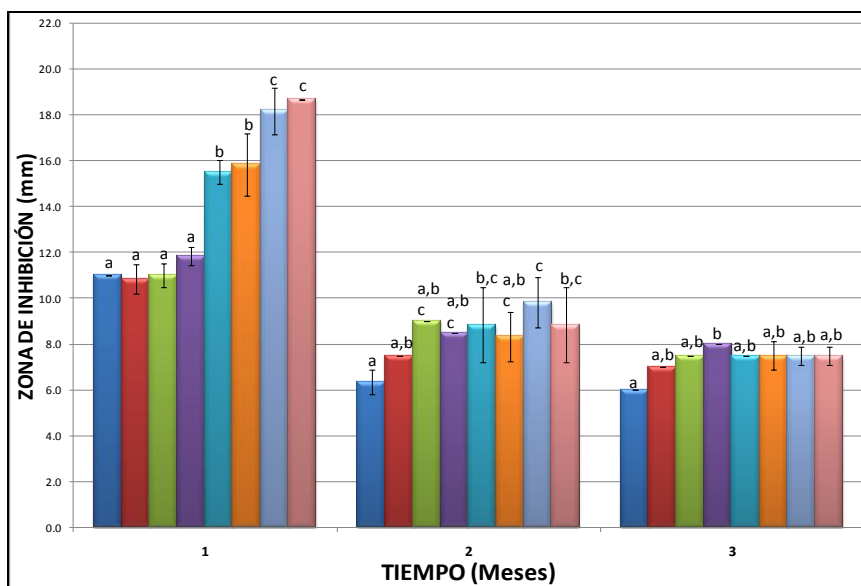


Figura 7.16. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 60% de humedad relativa sobre *E. coli* 43895 durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTv, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTv, ■ PJa, ■ PCl. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

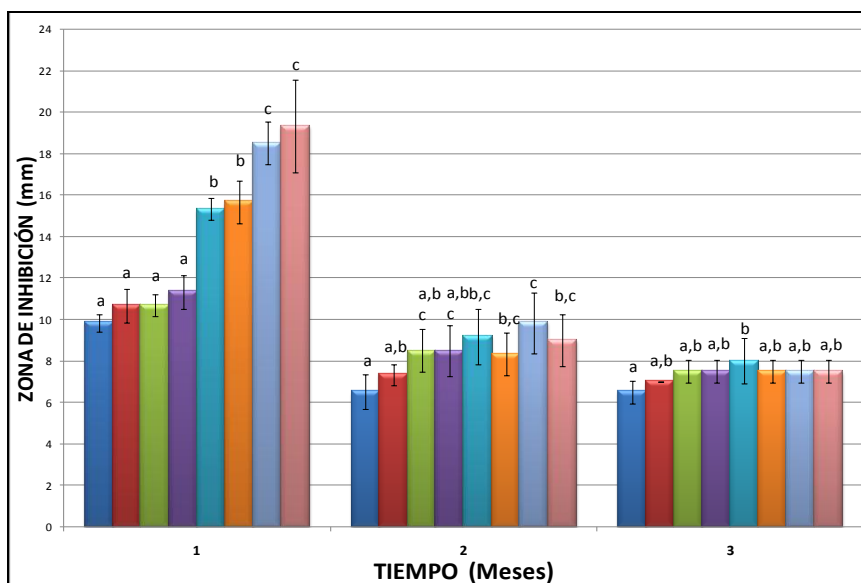


Figura 7.17. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 25% de humedad relativa sobre *E. coli* 43895 durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTv, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTv, ■ PJa, ■ PCl. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.1.4. Efecto de la humedad relativa sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *E. coli* 0157:H7

La prueba de ANOVA mostró una diferencia significativa ($p \leq 0.009$) entre las películas pero no entre las dos condiciones de humedad relativa ($p \geq 0.767$), ni en la interacción de los polímeros y la HR ($p \geq 0.907$).

Las películas elaboradas de pululano con *C. lechleri* tuvieron la mejor actividad antimicrobiana bajo las dos condiciones de HR, durante el primer mes de pruebas.

Al comparar todos los tratamientos, mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen 5 grupos de homogeneidad en el primer mes de pruebas. El grupo 1, formado por Q, Qtv, QJa; QCl, pertenece tanto al 1 como al 2; Ptv que es del grupo 2 y 3; P pertenece al grupo 3 y 4; PJa que es Grupo 4 y 5 y PJa en el grupo 5. Conforme pasaron los meses, la actividad de todos los polímeros decreció y en los meses 2 y 3 sólo se formaron 3 grupos de homogeneidad (Figura 7.18).

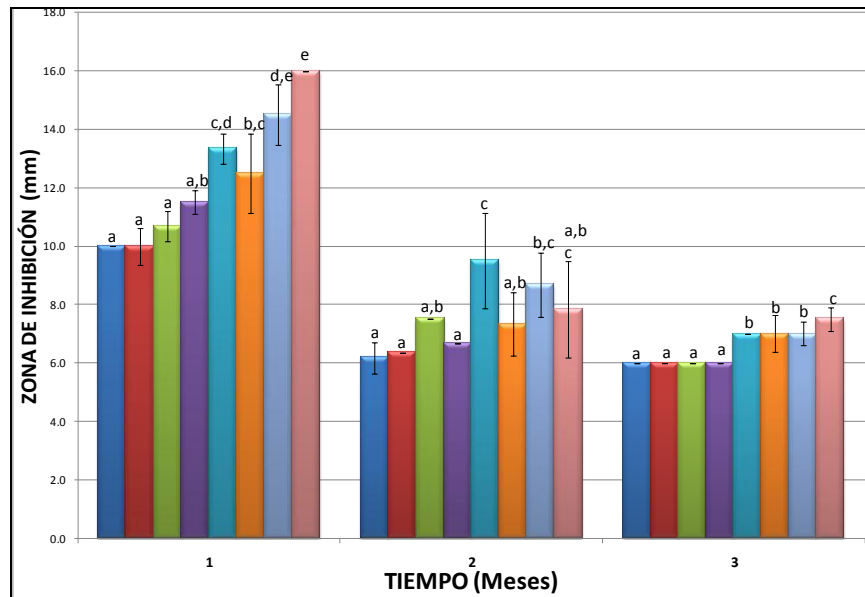


Figura 7.18. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 60% de humedad relativa sobre *E. coli* 0157:H7 durante tres meses. ■ Q sin extracto, ■ QTV, ■ QJa, ■ QCl, ■ P, ■ PTV, ■ PJa, ■ PCl. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

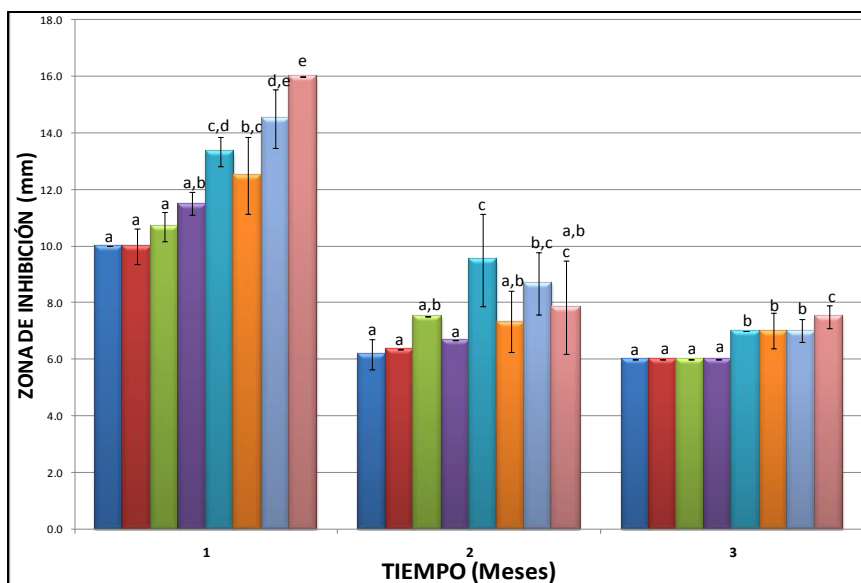


Figura 7.19. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a un 25% de humedad relativa sobre *E. coli* 0157:H7 durante tres meses de pruebas. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.2. Temperatura

Se evaluó el comportamiento de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C y 4°C. Los resultados muestran que la actividad antimicrobiana decreció conforme pasaron los meses, independientemente de las condiciones de almacenamiento.

7.5.2.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *A. actinomycetemcomitans*

En el análisis de varianza hubo diferencia significativa entre las películas ($p \leq 0.021$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas en las dos condiciones de temperatura de almacenaje ($p \geq 0.322$). Al comparar la interacción entre las dos temperaturas y la actividad antimicrobiana de las películas, se determinó que no hubo diferencia significativa en el comportamiento en ambos polímeros ($p \geq 0.260$).

La mejor actividad antimicrobiana fue para las películas elaboradas de pululano con *T. vulgaris*, almacenadas a 25°C, durante el primer mes. En el segundo mes, las de pululano sin extracto y durante el tercer mes, las de pululano con adicionadas con los tres extractos, fueron las que tuvieron un mejor comportamiento. Las películas almacenadas a 4°C la mejor actividad fue para las de quitosan con *C. lechleri* durante el primer mes de pruebas; mientras que en el segundo y tercer mes, las de pululano sin extracto y las de pululano con *J. adstringens* fueron las que presentaron un mejor comportamiento.

La prueba de Tukey determinó que en el primer mes del experimento, y bajo temperatura de 25°C, existen 4 grupos de homogeneidad: el grupo 1, al que pertenecen Q, QTv, QJa y QCl; el grupo 2, formado por PJa; el 3, por PCl y el grupo 4 por P y PTv. En los meses subsiguientes, la actividad antimicrobiana de todas las películas decreció (Figura 7.20).

Las películas almacenadas a 4°C formaron 3 grupos de homogeneidad durante el primero mes: Grupo 1, Q, QTv, P, PTv, PCl; en el grupo 2, QJa y PJa y en el grupo 3, QCl (Figura 7.21).

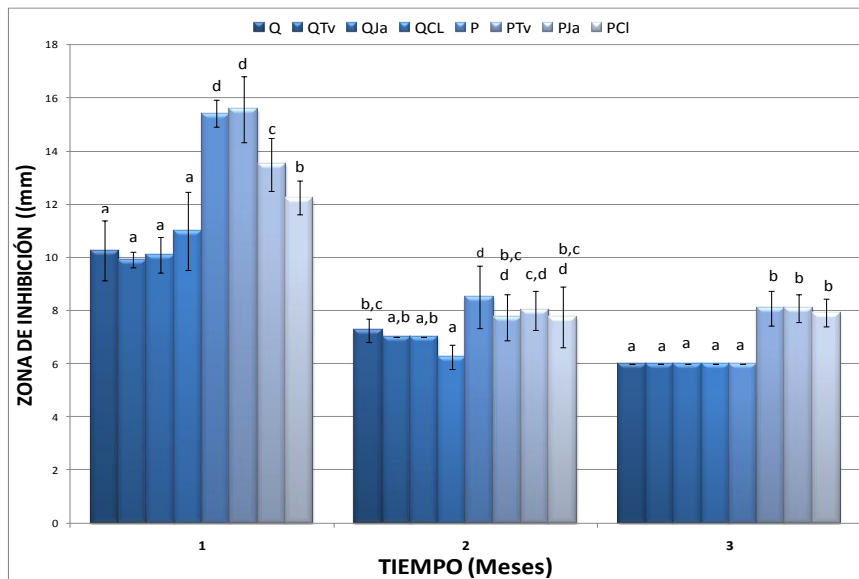


Figura 7.20. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C sobre *A. actinomycetemcomitans* durante tres meses de pruebas. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

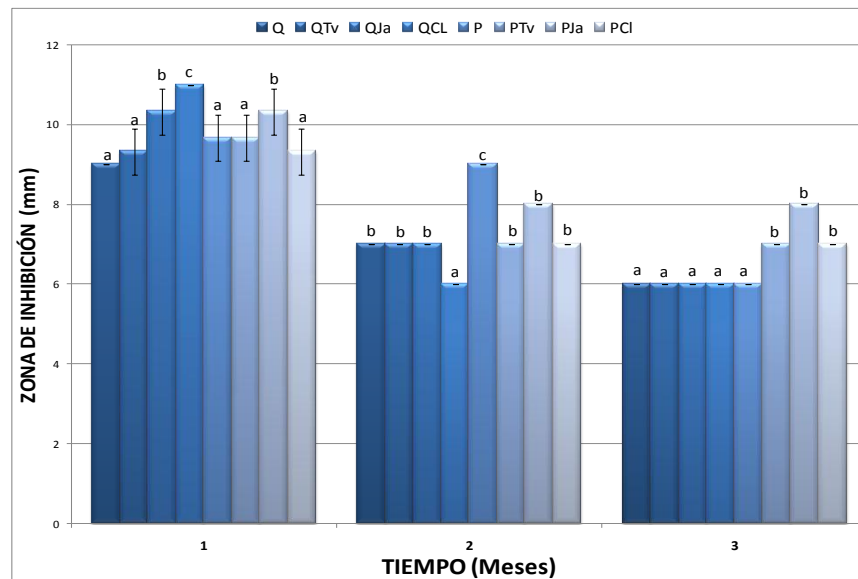


Figura 7.21. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas a una temperatura de 4°C sobre *A. actinomycetemcomitans* durante tres meses de pruebas. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.2.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *P. gingivalis*

Se evaluó el comportamiento de las películas almacenadas a 25°C y 4°C de temperatura. Todas las películas tuvieron un comportamiento muy similar durante el primer mes de pruebas, a ambas temperatura de almacenaje.

Como puede observarse en las Figuras 7.22 y 7.23, la actividad antimicrobiana decreció conforme pasaron los meses, independientemente de las condiciones de almacenamiento.

El análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre las diferentes películas con extractos ($p \leq 0.0000$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas en las dos condiciones de temperatura ($p > 1.000$), ni en la interacción de polímeros y temperatura ($p > 0.188$). Al comparar todos los tratamientos mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que en el primer mes y a una temperatura de 25°C, existen 4 grupos de homogeneidad. Los grupos de homogeneidad formados son: grupo 1, QTV; Q y P, que pertenecen tanto al grupo 1 como

al grupo 2; QJa que es del grupo 1,2 y 3; QCl que es del grupo 2, 3 y 4; PCl que es tanto del grupo 3 como del 4; y PTv y PJa que son del grupo 4.

En cuanto a las películas almacenadas a 4°C (Figura 7.23), se formaron tres grupos de homogeneidad: Q que es del grupo 1; QTv que es del grupo 1 y 2; P y PTv que son del grupo 1, 2 y 3; QJa , PJa y PCl que pertenecen al 2 y 3; y QCl que es del grupo 3.

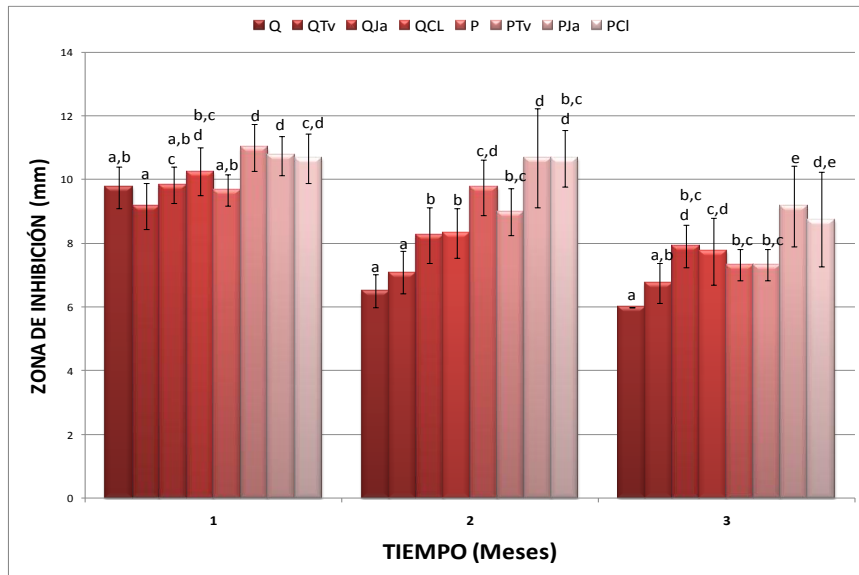


Figura 7.22. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas por tres meses, a una temperatura de 25°C sobre *P. gingivalis*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

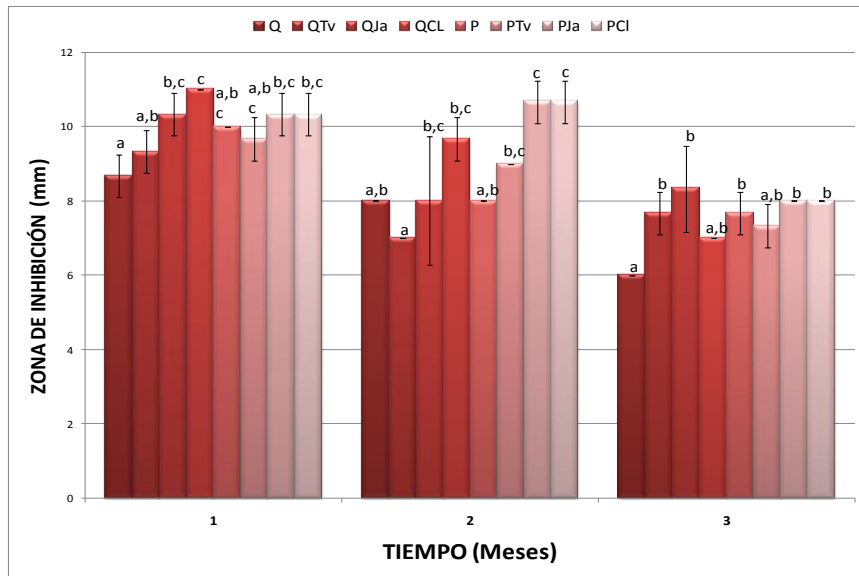


Figura 7.23. Actividad antimicrobiana de las películas almacenadas por tres meses, a una temperatura de 4°C sobre *P. gingivalis*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.2.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *E. coli* 43895

Durante el primer mes de pruebas, y almacenadas a 25°C, la mejor actividad antimicrobiana la presentaron todas las películas elaboradas de pululano, en particular las adicionadas con *C. lechleri*.

En el caso de las películas almacenadas a 25°C y 4°C, el análisis de varianza demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las películas, así como entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas en las dos condiciones de temperatura ($p \leq 0.0000$).

La prueba de Tukey determinó que las películas almacenadas a 25°C formaron 4 grupos de homogeneidad: el grupo 1 constituido por Q, QTv, QJa, QCL; el 2 por, P y PTV y el 3 por PJa y PCI. Sin embargo, las películas almacenadas a 4°C tuvieron el mismo comportamiento el primer mes, resultando sólo un grupo de homogeneidad.

Como puede observarse en las Figuras 7.24 y 7.25, la actividad decreció en el segundo y tercer mes de pruebas.

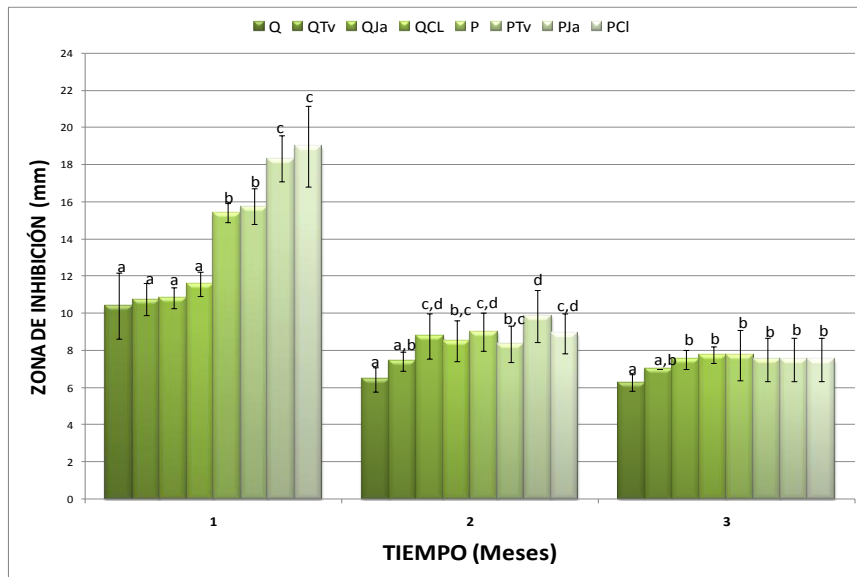


Figura 7.24. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, a una temperatura de 25°C en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 43895. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

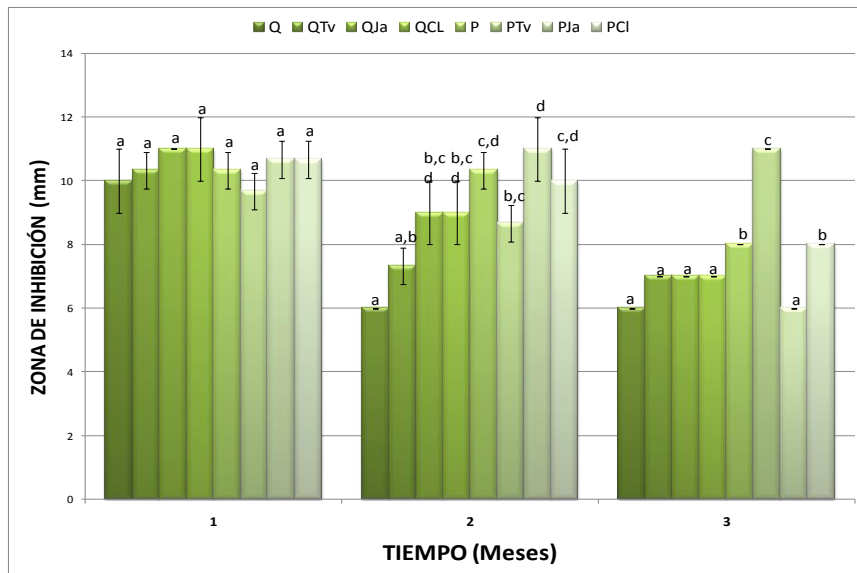


Figura 7.25. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, a una temperatura de 4°C en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 43895. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.2.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *E. coli* 0157:H7

Todas las películas elaboradas a base de pululano presentaron la mejor actividad inhibitoria, en especial aquellas adicionadas con *C. lechleri* y almacenadas a 25°C; mientras que, a 4°C, las de quitosan sin extracto fueron las de mejor comportamiento.

En el caso de las películas almacenadas a 25°C y 4°C, el análisis de varianza demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las películas ($p \leq 0.0000$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas en las dos condiciones de temperatura ($p > 0.099$).

La prueba de rangos múltiples de Tukey determinó que se formaron 5 grupos de homogeneidad en el primer mes de almacenamiento y a 25°C: el grupo 1 formado por Q y QTv; QJa y QCl que están en el grupo 1 y 2; PTv que pertenece al 2 y 3; P que es tanto del 3 como del 4; PJa pertenece al grupo 4 y PCl del grupo 5 (Figura 7.26).

Las películas almacenadas a 4°C, durante el primer mes de pruebas, tuvieron 3 grupos de homogeneidad: el grupo 1, formado por QTv, QJA, P, PTv; el grupo dos, QCl y PJa; y el grupo 3 por Q. PCl pertenece tanto al 2 como al 3.

En las Figuras 7.26 y 7.27, se muestra como la actividad inhibitoria decreció en el segundo y tercer mes de pruebas.

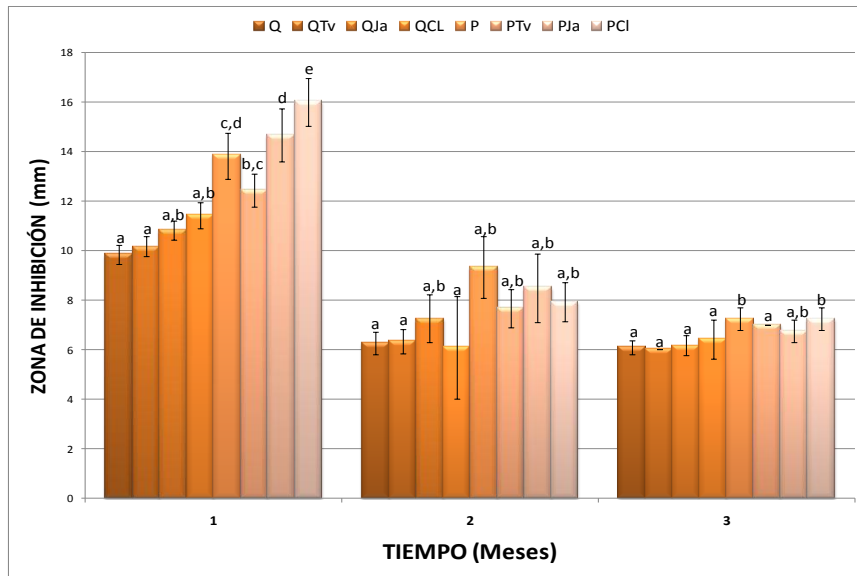


Figura 7.26. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, a una temperatura de 25°C en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 0157:H7. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

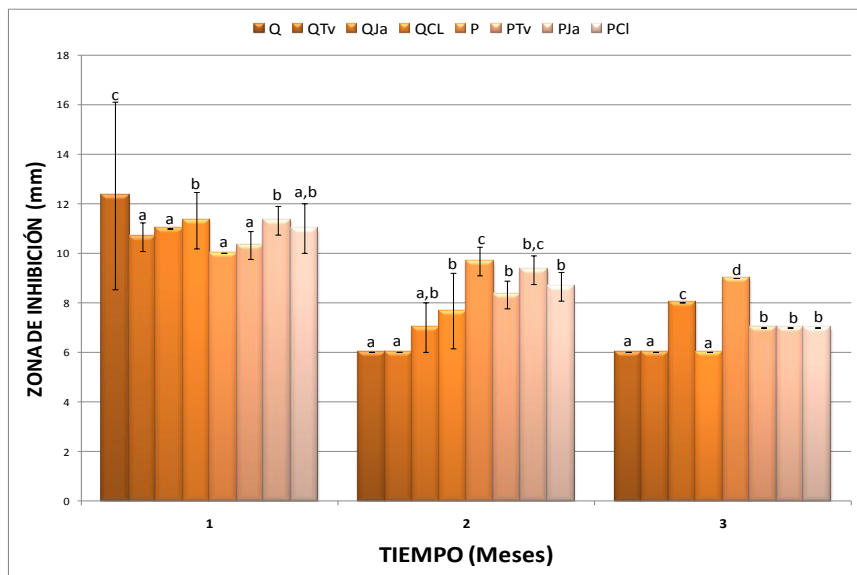


Figura 7.27. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, a una temperatura de 4°C en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 0157:H7. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.3. Iluminación

Se evaluó el comportamiento de las películas almacenadas bajo condiciones de luz y oscuridad. Los resultados muestran que la actividad antimicrobiana decreció conforme pasaron los meses, independientemente de las condiciones de almacenamiento.

7.5.3.1. Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad

antimicrobiana de las películas en cepas de *A. actinomycetemcomitans*

Los resultados del análisis de varianza demostraron que hay diferencia altamente significativa ($p \leq 0.0000$) entre las películas almacenadas bajo las dos condiciones de iluminación pero no en los resultados obtenidos de la interacción entre las películas y la iluminación ($p > 0.921$).

Las películas de pululano con *T. vulgaris*, almacenadas en condiciones de luz, el primer mes de almacenamiento, mostraron la mejor actividad antimicrobiana contra *A. actinomycetemcomitans*; mientras que las almacenadas bajo condiciones de oscuridad, las de pululano sin extracto y pululano adicionado con *T. vulgaris*, fueron las mejores.

Al comparar todos los tratamientos mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que en el primer mes, y almacenadas bajo condiciones de luz, existen 5 grupos de homogeneidad: Q que pertenece al grupo 1; QTV y QJA que son tanto grupo 1 como 2; QCI que es grupo 2 y 3; PCI que es del grupo 3 y 4; PJA del grupo 4 y PTv y P que forman el grupo 5 (Figura 7.28).

Las películas almacenadas bajo condiciones de oscuridad presentaron los siguientes grupos de homogeneidad en el primer mes de almacenamiento: QTV, grupo 1; Q, QJA y QCI pertenecen al grupo 2; PCI es del grupo 1, 2 y 3; PJA, grupo 2 y 3; P y PTv son del grupo 3.

En las figuras 7.28 y 7.29 se observa que la actividad disminuyó con el paso de los meses independientemente de las condiciones de iluminación.

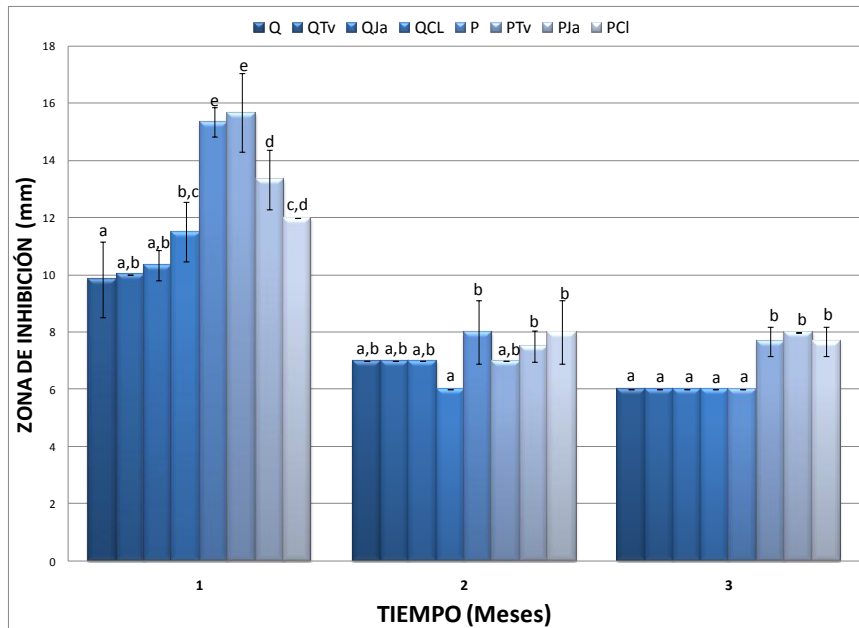


Figura 7.28. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de *A. actinomycetemcomitans*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

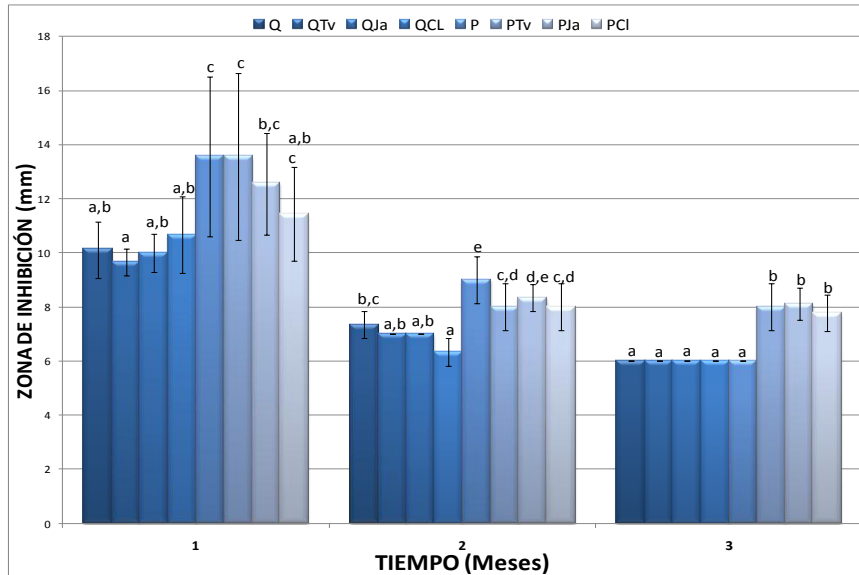


Figura 7.29. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de oscuridad en la actividad antimicrobiana de *A. actinomycetemcomitans*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.3.2. Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *P. gingivalis*

Las películas almacenadas bajo las dos condiciones de iluminación tuvieron un comportamiento muy similar independientemente del polímero con que se elaboraron. A pesar de esto, el análisis de varianza destacó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las películas y entre los resultados de las películas almacenadas bajo las dos condiciones de iluminación ($p \leq 0.0000$).

Al comparar todos los tratamientos mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que en el primer mes, bajo condiciones de luz, existen 2 grupos de homogeneidad: el grupo 1, formado por Q, QTv; el dos por P y QJa, QCl, PTv, PJa, PCl pertenecen tanto al 1 como al 2 (Figura 7.30). Para las películas almacenadas bajo condiciones de oscuridad (Figura 7.31), el primer mes de pruebas, se formaron 3 grupos de homogeneidad: el grupo 1, QTv; Q, que pertenece tanto al 1 como al 2; QJa y P que son del grupo 1, 2 y 3; QCl que es 2 y 3; PTv, PJa, PCl que forman el grupo 3. En las figuras 7.30 y 7.31 puede observarse al comportamiento de las películas conforme pasó el tiempo.

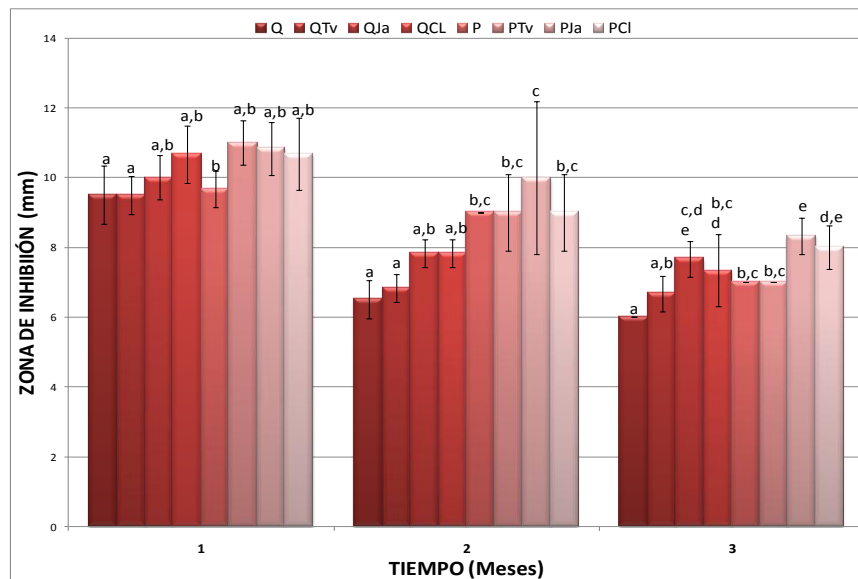


Figura 7.30. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de *P. gingivalis*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

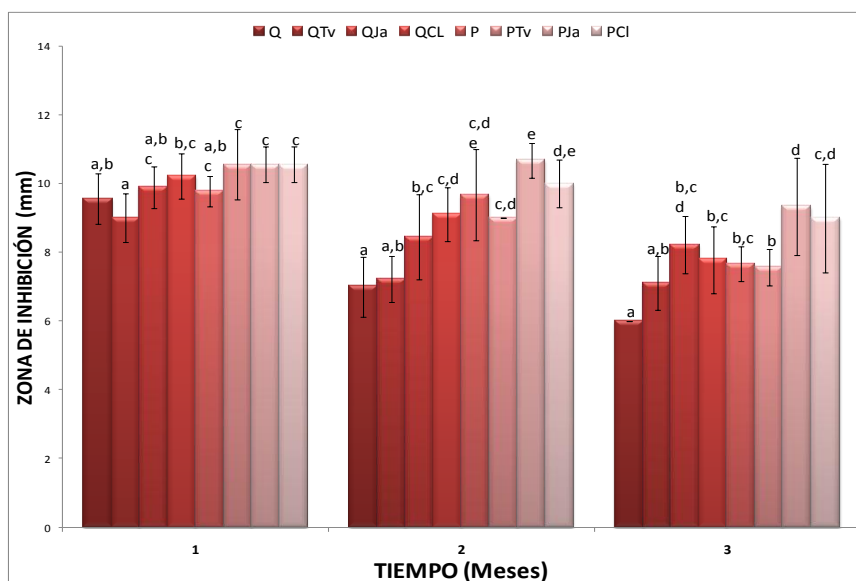


Figura 7.31. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de obscuridad en la actividad antimicrobiana de *P. gingivalis*. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.3.3. Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *E. coli* 43895

Todas las películas probadas mostraron actividad antimicrobiana contra esta cepa, sin embargo fue más marcada en el caso de pululano con *C. lechleri*, almacenada bajo condiciones de luz, en el primer mes de su elaboración. En las almacenadas en obscuridad, la mejor actividad fue para las películas elaboradas de pululano con *J. adstringens* y con *C. lechleri*.

Como puede apreciarse en la Figura 7.32 y 7.33, igual que en las otras condiciones de almacenaje, la actividad antimicrobiana decreció conforme pasó el tiempo de pruebas.

El análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre las diferentes películas ($p \leq 0.0000$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas bajo las dos condiciones de iluminación ($p > 0.074$). Al comparar todos los tratamientos, mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que, en el primer mes y bajo condiciones de luz, existieron 3 grupos de homogeneidad: el grupo 1 formado por Q, Qtv, QJa, QCl; el dos por P y PTV; el tres constituido por PCl. PJa

pertenece tanto al grupo 2 como al 3. En cuanto a las películas almacenadas bajo condiciones de oscuridad, en el primer mes de pruebas: Q constituye el grupo 1; QTv, QJa, QCl son grupo 1 y 2; P y PTv son grupo 1, 2 y 3; y PJa, PCl son grupo 3.

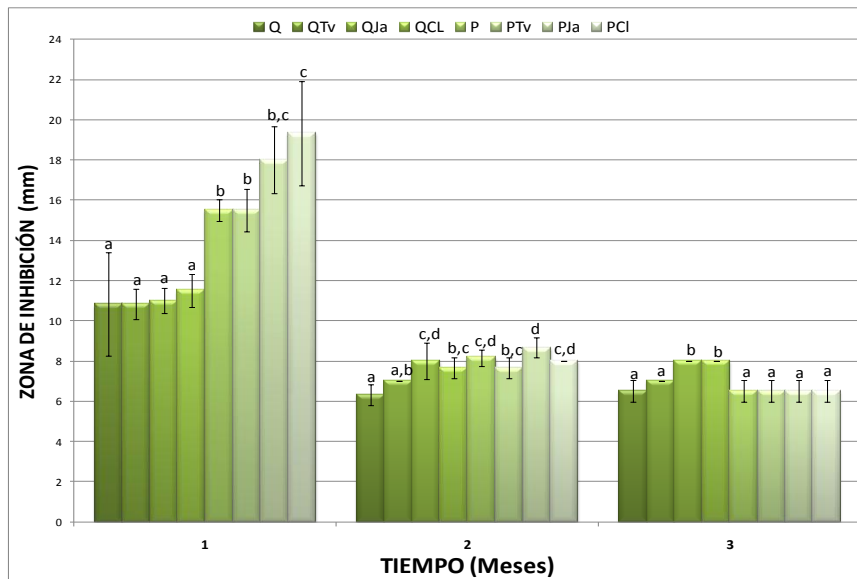


Figura 7.32. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 43895. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

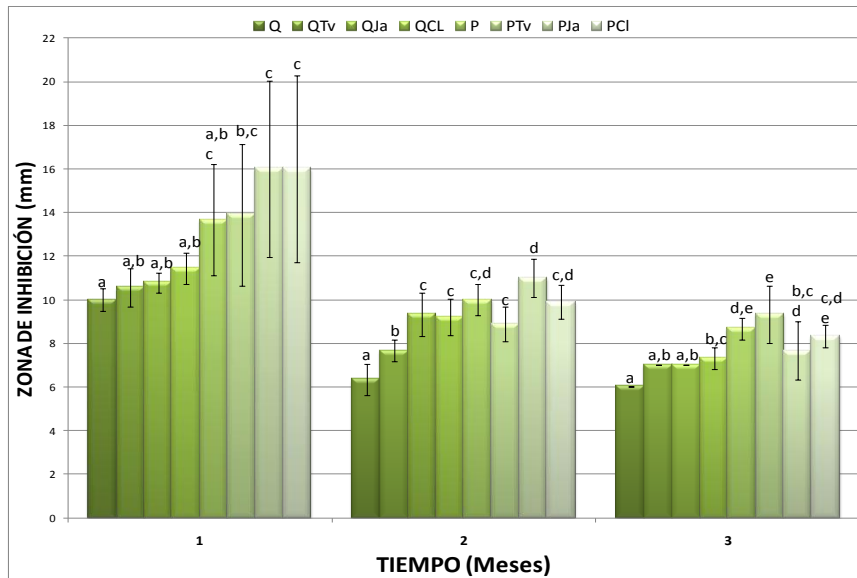


Figura 7.33. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de obscuridad en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 43895. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.5.3.4. Efecto de las condiciones de iluminación sobre la actividad antimicrobiana de las películas en cepas de *E. coli* 0157:H7

Durante el primer mes de elaboración y bajo ambas condiciones de iluminación, las películas de pululano con *C. lechleri* tuvieron la mejor actividad antimicrobiana.

En el análisis de varianza hubo diferencia altamente significativa entre las películas ($p \leq 0.0000$) pero no entre los resultados obtenidos de las películas almacenadas bajo las dos condiciones de iluminación ($p > 0.207$).

La prueba de Tukey determinó que en el primer mes del experimento, bajo condiciones de luz, existen 5 grupos de homogeneidad: el grupo 1, al que pertenecen Q, QTv, QJa; QCL que es grupo 1 y 2; PTV son grupo 2 y 3; P es grupo 3 y 4; PJa, 4 y 5; PCI es del grupo 5. Para las películas almacenadas bajo condiciones de obscuridad, QTv pertenecen al grupo 1; QJa, QCL son del grupo 1 y 2; Q, P y PTV son del grupo 1, 2 y 3; PJa es del grupo 2 y 3; PCI, es grupo 3. En las figuras 7.34 y 7.35 se observa el comportamiento de las películas durante los meses subsiguientes a su elaboración.

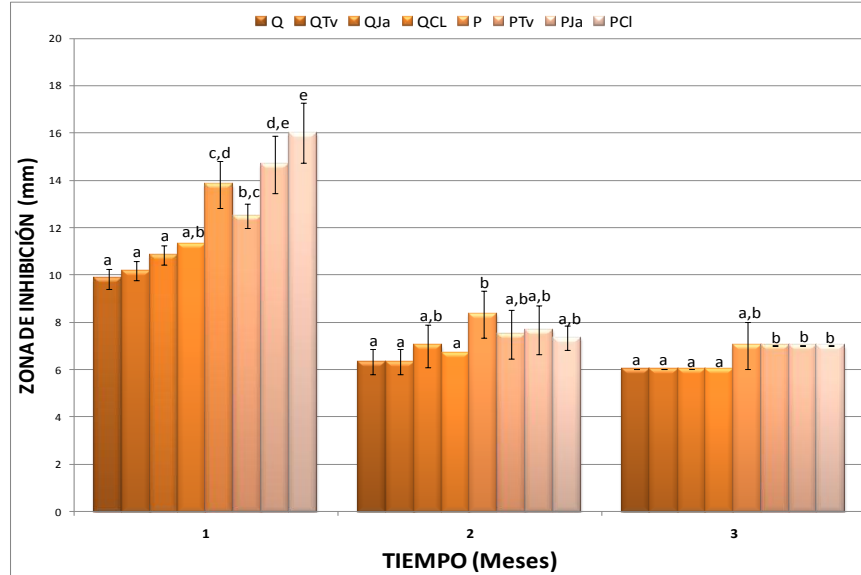


Figura 7.34. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de luz en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 0157:H7. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

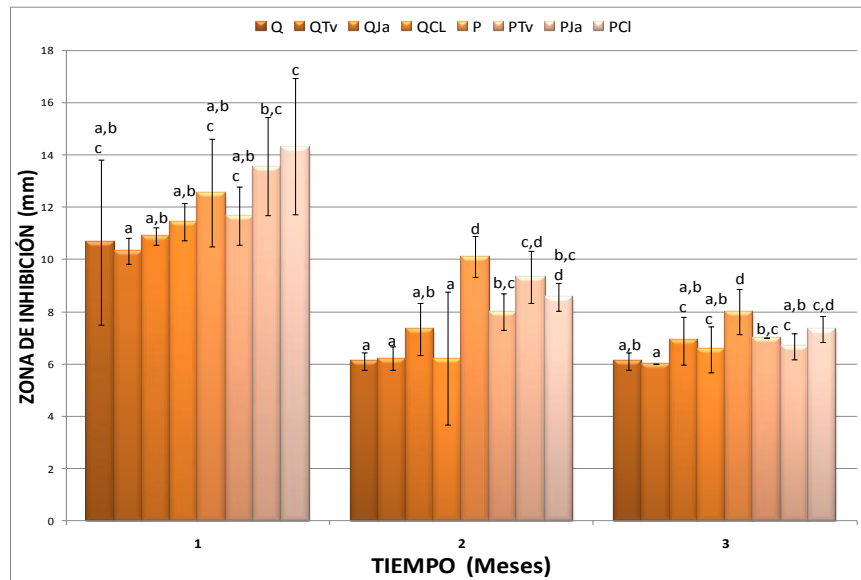


Figura 7.35. Comportamiento de las películas almacenadas por tres meses, bajo condiciones de oscuridad en la actividad antimicrobiana de *E. coli* 0157:H7. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes. Las letras minúsculas diferentes expresan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

5. DISCUSIÓN

La liberación local y tópica de agentes quimioterapéuticos para el control de las enfermedades periodontales es considerada la mejor opción debido a una muy baja incidencia de efectos secundarios comparada con la vía sistémica.

A pesar de que en los últimos años la industria farmacéutica ha desarrollado un gran número de nuevos antibióticos, la resistencia de los microorganismos a dichas drogas, continúa. En general, las bacterias tienen la habilidad genética para transmitir y adquirir resistencia a drogas que son utilizadas como agentes terapéuticos. El aumento prevalente de microorganismos multi-resistentes así como los efectos secundarios indeseables de algunas drogas, hace que la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos sea una importante estrategia para el establecimiento de terapias alternativas con productos naturales.

Los productos naturales derivados de plantas medicinales son una importante fuente de compuestos biológicamente activos, de baja toxicidad, para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas y que han servido de base para el desarrollo de nuevos medicamentos. Los resultados obtenidos en este trabajo con el uso *in vitro* de extractos de *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* y *Juliana adstringens* confirman que algunos componentes químicos les confieren propiedades antimicrobianas contra patógenos causantes de periodontitis.

Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

Todos los extractos de plantas probados en este estudio mostraron algún grado de actividad antimicrobiana contra las cuatro cepas probadas, a pesar de ser extractos comerciales.

Las pruebas realizadas para evaluar las propiedades antimicrobianas de las cinco plantas demostraron que la CMI de *J. adstringens* contra *P. gingivalis* y *E. coli* 43895 fue la mejor, al igual que *C. lechleri* para *A. actinomycetemcomitans* y *E. coli*

43895 ya que se requirieron concentraciones de 37 mg/mL para tener inhibición. El extracto de *C. officinalis* requirió concentraciones mayores de extracto (250 mg/mL) para tener la CMI contra *A. actinomycetemcomitans*. Huerta y col en el 2008, determinaron que para la CMI de extracto de *J. adstringens* contra *P. aureoginosa* se requieren concentraciones de 370-495 g/mL.

En ocasiones, la concentración mínima inhibitoria y la bactericida son equivalentes. En este trabajo, *T. vulgaris* mostró la misma CMI y CMB contra cepas de *P. gingivalis* y *E. coli* 43895, al igual que *J. adstringens* para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*; *C. officinalis* contra *A. actinomycetemcomitans* y *C. lechleri* contra ambos periodontopatógenos.

Elaboración de películas de biopolímeros

A principios de los 70's, los polímeros naturales y sintéticos empezaron a ser investigados para formulaciones de liberación controlada. Las ventajas de usar polímeros biodegradables en aplicaciones clínicas son múltiples e incluyen: facilidad de administración, la baja frecuencia de aplicaciones y la comodidad y confianza referida por los pacientes.

En los pasados años, se han incrementado las investigaciones de sistemas de liberación de fármacos y se han registrado muchas patentes para su uso en diversas aplicaciones biomédicas. Los sistemas poliméricos inteligentes representan un campo prometedor en la liberación de medicamentos.

Dependiendo de la vía de administración, esos sistemas poliméricos pueden ser clasificados en:

1. Sistemas para administración oral
2. Sistemas para aplicación tópica
3. Sistemas para liberación ocular
4. Sistemas para administración rectal y vaginal
5. Sistemas inyectables
6. Sistemas para liberación nasal

Debido a los bajos costos de producción, biodegradabilidad, biocompatibilidad y la reciente aprobación de FDA en la aplicación farmacéutica e industria alimentaria, el uso de quitosan se ha incrementado notablemente en los últimos años (Muzzarelli, 1996).

Por otro lado, el pululano tiene propiedades mucoadhesivas, biodegradables, biocompatibles y es comestible lo cual lo convierte en una excelente opción para su uso en la liberación de fármacos y extractos de plantas que tienen propiedades medicinales.

La influencia de las condiciones del procesamiento en las variables de grosor, pH, solubilidad, propiedades físicas, actividad antimicrobiana, vida útil, etc., son características de gran importancia en la preparación de sistemas de liberación de drogas.

De acuerdo a la revisión realizada, muchas de las etapas en el proceso de elaboración y caracterización de membranas de biopolímeros no están descritas en la literatura. Así que, en este trabajo, fueron realizadas diversas pruebas para establecer las características necesarias para este propósito.

La reproducción de algunos procedimientos descritos en la literatura dieron como resultado la obtención de muestras no adecuadas para su uso. Dentro de las principales dificultades encontradas, se destaca la obtención de películas que no se desprendían de las placas de acrílico, como en el caso de las películas de quitosan con el extracto de *J. adstringens* y de películas de pululano que eran muy quebradizas.

pH

Las propiedades del quitosan son dependientes del peso molecular, el grado de desacetilación y la viscosidad. Se ha encontrado que el quitosan con un grado de desacetilación relativamente bajo (40%) es soluble a pH 9, mientras que el quitosan de un grado de desacetilación ~85% es soluble a un pH 6.5 y la viscosidad del mismo se incrementa (Bishe *et al*, 2006).

El quitosan es soluble en soluciones ácidas, por lo que se agregó ácido acético. En el caso del pululano sólo se agregó agua destilada y D-sorbitol como plastificante por lo que su pH se mantuvo en rangos entre 5.5 y 6. El pH promedio de las formulaciones fue de 3.9 para quitosan y de 5.7 para el pululano.

Grosor

Los valores referentes al grosor presentaron variaciones. Esto puede ser debido a que se usó una cucharilla de extensión manual y no un extrusor mecánico. Otra razón para estos resultados puede ser a causa de las características propias de cada mezcla de los polímeros empleados.

Trabajos previos en donde se han evaluado diversas características de las películas elaboradas a base de quitosan, han reportado grosores promedio $19.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (Juliano *et al.*, 2008), entre 18 e $48 \mu\text{m}$ (Yan *et al.*, 2000) y entre 24 e $26 \mu\text{m}$ (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001), mientras que en este trabajo el grosor fue de 0.03 mm. Las películas de pululano tuvieron un grosor promedio de 0.072 mm.

Para el propósito planteado en este trabajo, todas las membranas obtenidas presentaron potencial para ser utilizados como vehículos de liberación de drogas.

Hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las películas elaboradas de quitosan sin extracto (Q), quitosan- *T. vulgaris* (QTV) y quitosan- *C. lechleri* (QCL) con las de quitosan- *J. adstringens* (QJA). Probablemente esto se deba al uso de glicerol en su formulación ya que promueve un aumento en el grosor de las películas por su acción en la separación de las cadenas poliméricas.

No hubo diferencias significativas entre las películas de pululano pero sí entre éstas y las elaboradas con quitosan: las de pululano resultaron más gruesas. Probablemente la adición de sustancias como los extractos de plantas, también le confieran una estructura más gruesa, como sucede al adicionar glicerol y sorbitol.

Solubilidad

En el presente trabajo se realizaron pruebas de solubilidad de las películas elaboradas de quitosan y pululano y adicionadas con los extractos de plantas. Las pruebas se realizaron colocando 3 mL de saliva artificial pH 7.2 en vidrios de reloj y cronometrando la disolución total de las películas.

Las propiedades físicas y químicas de las películas representan un importante papel en la determinación del grado de liberación de drogas incorporadas, siendo que el medio utilizado para la disolución de un fármaco puede tener un efecto decisivo en su cinética de liberación (Wang *et al.*, 2000).

Las propiedades de solubilidad de las películas es un importante parámetro para su aplicación en mucosa oral. En este sentido, las películas de pululano, además de haber presentado la mejor actividad antimicrobiana, se solubilizaron en períodos de 15 seg. a 25 seg. Las películas de quitosan con *T. vulgaris* y quitosan con *C. lechleri*, se disolvieron en 50 seg a 130 seg en promedio. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Juliano *et al.* (2008), que tuvieron tiempos de solubilidad de 45 seg.; mientras que las de quitosan que no presentaron disolución (quitosan puro y quitosan con extracto de *J. adstringens*) conservaron su forma y consistencia después de mantenerlas inmersas en la saliva artificial por más de 24 horas.

La característica de combinación de los enlaces α -(1-6) y α -(1-4) del pululano da como resultado dos propiedades distintivas: la flexibilidad y su marcada solubilidad, lo cual sugiere que puede ser utilizado con propósitos médicos e industriales (Leathers, 2003).

Cuando las películas de pululano con y sin extracto, y las de quitosan adicionadas con *T. vulgaris* y *C. lechleri* fueron colocadas en la saliva artificial, adquirieron una consistencia de gel hasta su total disolución.

Una vía de disolución del quitosan y algunos polímeros en el organismo ocurre por la acción de la lisozima, una enzima que es auxiliar del sistema inmunológico ya que disuelve la pared de mucopolisacáridos de las bacterias por la hidrólisis de las uniones β (1→4). Esta enzima se encuentra comúnmente presente en fluidos corporales como la saliva (<150 mg/100mL) y las lágrimas (18 a 80 mg/mL) además de ser encontrada libremente disuelta en gran parte de los tejidos (Martini, 1995).

A pesar que el quitosan es considerado un polímero soluble en medios que contienen lisozimas, tal solubilidad es dependiente, dentro de otros factores, del grado de desacetilación del quitosan. Cabe mencionar que en este trabajo se empleó saliva artificial, que a pesar de ser muy similar a la saliva normal, difiere en cuanto a su composición en el contenido de enzimas. Es probable también que el ácido acético residual presente en las películas de quitosan puro o el propio extracto de *C. lechleri* y *T. vulgaris*, hayan incrementado su carácter hidrofílico y que haya habido disolución de las películas aún en un medio con un pH neutro.

Actividad antimicrobiana de los biopolímeros

En los ensayos realizados en el presente trabajo, para determinar la actividad inhibitoria de las películas, las bacterias fueron inoculadas en el agar antes de colocar los discos de polímeros. Se utilizó la prueba de difusión en agar evaluando la formación de halos de inhibición de crecimiento microbiano. Fue posible comprobar que las bacterias utilizadas en este trabajo mostraron inhibición de crecimiento alrededor de las películas y sobre las mismas, confirmando la actividad bacteriostática o bactericida de los propios polímeros y (o) de los extractos de las plantas.

Cuando se usan biomateriales para su uso como medicamentos, deben ser esterilizados antes de su utilización para que estén libres de cualquier microorganismo, en todas sus formas de vida, o bien de partículas contaminantes que se adhieren a las películas durante el proceso de elaboración (Ratner *et al.*, 1996).

En este trabajo las películas fueron esterilizadas sólo con luz ultravioleta por un período de 45 minutos previos a su colocación en las placas de agar conteniendo los diferentes inóculos.

La actividad antimicrobiana de los polímeros se da por dos posibles vías: por la interacción del polímero cargado positivamente, por su disociación con los componentes de la pared celular bacteriana cargados negativamente, causando la inhibición del crecimiento bacteriano por la destrucción de la pared celular, o bien por la liberación del fármaco incorporado a las películas que actuaría también sobre la pared celular.

Pinzelik *et al.*, (1953) evaluaron la susceptibilidad de *Micrococcus flavus* a discos de polímeros conteniendo bacitracina en diferentes concentraciones, teniendo como resultado, halos de inhibición de 18mm.

Coleman *et al.*, (1977), utilizaron discos conteniendo bacitracina mismos que formaron halos de inhibición de 11 mm en cepas de *Streptococcus*.

Estos resultados son similares a algunas de las películas probadas en este trabajo como en el caso de pululano- *T. vulgaris* (PTv) sobre cepas de *A. actinomycetemcomitans*, pululano (P) y pululano- *T. vulgaris* (PTv) en cepas de *E. coli* 43895, por citar algunos. Aunque también se tuvieron halos de mayor tamaño, como los producidos por pululano- *J. adstringens* (PJa) y pululano- *C. lechleri* (PCI), que tuvieron, en promedio, la mejor actividad antimicrobiana contra las cepas probadas.

Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos dan muchas veces resultados significativamente diferentes debido a varios factores como la incidencia de resistencia o de susceptibilidad de los microorganismos. Otro factor a considerar es la existencia de períodos de atraso que pueden ocurrir durante los ensayos con antibióticos u otras sustancias, que son agregadas mucho tiempo antes de las pruebas, o bien durante las pruebas mismas, pudiendo resultar en la formación de halos de mayor o menor tamaño. De esta forma se puede concluir que los ensayos de formación de halos de inhibición en las pruebas de susceptibilidad a medicamentos deben ser conducidos en condiciones predeterminadas, buscando minimizar los posibles errores experimentales.

Vida útil

El quitosan mata a las bacterias a través de daño en la membrana celular, incrementando la permeabilidad de la pared interna y externa de la membrana hasta la destrucción de la misma (Liu *et al.*, 2004). Esos daños son causados por interacción electrostática entre los grupos amino del quitosan y los grupos fosforilo de los componentes fosfolipídicos de la membrana celular.

Las películas de quitosan mostraron una más baja actividad antimicrobiana sobre las cepas probadas comparadas con las de pululano. Esto puede ser debido, en parte, a la alta viscosidad del quitosan que impide su difusión en el agar y la liberación de los extractos.

Los polialcoholes, como el D-sorbitol, brindan una buena plasticidad a las películas debido a su habilidad para reducir los enlaces internos de hidrógeno mientras incrementan los espacios intermoleculares (MacHugh *et al.*, 1994).

La adición de agentes plastificantes disminuye la viscosidad de la solución; esto podría explicar la actividad antimicrobiana mostrada por las películas de pululano.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las películas fueron estables bajo las condiciones de almacenamiento de humedad relativa, temperatura y luz, aunque es probable que su actividad antimicrobiana haya disminuido debido a que los

extractos hayan perdido sus propiedades antibacterianas con el paso del tiempo o bien que su actividad decreciera por acción de la etapa de esterilización de las películas.

No hubo diferencia significativa entre las películas almacenadas a una humedad relativa del 60% y del 25% para ninguna de las cepas, lo que hace suponer que, independientemente de estas condiciones de humedad, el desempeño como vehículos de liberación de drogas no se ve alterado.

En el caso de las películas almacenadas a una temperatura de 25°C y 4°C, éstas fueron significativamente diferentes entre sí pero no hubo diferencia a causa del almacenamiento bajo las dos temperaturas, a excepción del efecto que tuvieron sobre cepas de *E. coli* 43895 en que hubo una diferencia significativa entre las películas almacenadas a 25°C o 4°C. Esto puede ser debido a las características propias de la cepa, o bien a que las películas empleadas en esta prueba, se hayan visto modificadas por dichas condiciones de almacenaje.

Las condiciones de almacenaje con luz u oscuridad, afectaron significativamente a las películas usadas contra cepas de *P. gingivalis* pero no al resto de las cepas. Hubo una diferencia significativa entre las películas entre sí, pero no la hubo entre las temperaturas para el resto de los microorganismos probados.

La morfología de las películas mostró una superficie aparentemente lisa, brillante y con ausencia de poros. El color de las películas tanto de quitosán como pululano sin extractos, fue translúcido. Las películas adicionadas con extracto de *T. vulgaris* fueron de un color amarillo claro, las adicionadas con *J. adstringens* fueron de un color café rojizo y las de *C. lechleri* de color ocre. Todas estas características, además de la flexibilidad y la forma, se mantuvieron con el paso del tiempo a diferencia de la actividad antimicrobiana que decreció conforme pasó el tiempo.

Después de la esterilización con luz UV, no se observaron cambio de color o de forma. Sin embargo, este comportamiento es diferente a los cambios que se producen con otros métodos de esterilización como la radiación gamma. De acuerdo a Skiens (1980), el color amarillento de los materiales poliméricos asociado al uso de radiación gamma puede ser debido a la formación de complejos coloridos durante la irradiación, y que eventualmente puede alterar las características de las películas y causar un deterioro progresivo de sus propiedades, incluido su aspecto visual y sus propiedades mecánicas.

Por todo eso, dentro de los diversos métodos de elaboración, esterilización y almacenaje de biopolímeros, debe elegirse aquel que mejor se adapte a las necesidades específicas del biomaterial y al propósito básico para el cual están siendo diseñados.

Conforme a lo discutido anteriormente se puede decir que las propiedades mostradas por las películas elaboradas a partir de quitosan y pululano y adicionadas con extractos acuosos de plantas son consideradas adecuadas para ser empleados como vehículos de liberación de los principios activos de plantas o de otras sustancias.

Cabe destacar que ambos polímeros son materiales muy versátiles que permiten se puedan agregar otros elementos para mejorar sus propias características sin modificar su actividad para que sean empleadas con otro propósito y que, la adición de los extractos acuosos de plantas, resultó una opción promisoriosa para su uso en el tratamiento tópico de la enfermedad periodontal.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, es posible decir que:

1. Los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de *T. vulgaris*, *M. chamomilla*, *J. adstringens*, *C. officinalis*, *C. lechleri* mostraron algún grado de actividad inhibitoria sobre todas las cepas probadas.
2. Las pruebas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida revelaron que los extractos de *T. vulgaris*, *J. adstringens* y *C. lechleri* tuvieron la mejor actividad antimicrobiana en las cepas probadas con concentraciones entre 37 mg/mL a 111 mg/mL.
3. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida para el extracto de *C. lechleri* contra cepas de *A. actinomycetemcomitans* fue de 37 mg/mL.
4. El extracto de *J. adstringens* mostró la mejor actividad antimicrobiana contra cepas de *P. gingivalis* donde la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida fue de 37 mg/mL.
5. Los ensayos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida revelaron que el extracto de *J. adstringens* exhibió los mejores resultados sobre cepas de *E. coli* 43895 a concentraciones de 37 mg/mL y 63 mg/mL respectivamente.
6. Los extractos de *T. vulgaris*, *J. adstringens* y *C. lechleri* tuvieron resultados similares sobre cepas de *E. coli* 0157:H7 para una concentración mínima inhibitoria de 63 mg/mL y una concentración mínima bactericida 111 mg/mL.
7. La mejor formulación de quitosan al adicionarle los extractos de *T. vulgaris* y *C. lechleri* fue a una concentración al 1% y al 0.8% con glicerol al 0.2% como plastificante para las películas de quitosan con extracto de *J. adstringens*.

8. La mejor formulación para la elaboración de las películas de pululano fue al 10%, adicionado con D-Sorbitol al 0.3%.
9. Las pruebas de determinación del pH indicó que el promedio fue de 3.9 para las formulaciones de quitosan y de 5.7 para las de pululano.
10. La caracterización de las películas en relación al grosor demostró que hubo una diferencia significativa entre ambos polímeros. El grosor promedio de las películas de quitosan fue de 0.03mm y de 0.07mm para el pululano.
11. En los ensayos de solubilidad, las películas de pululano tuvieron una rápida disolución mientras que las de quitosan tardaron más en disolverse, y en el caso de quitosan sin extracto y quitosan con *J. adstringens*, no se disolvieron después de 24 horas.
12. Las películas de pululano y las de pululano con *T. vulgaris* mostraron la mejor actividad antimicrobiana contra *A. actinomycetemcomitans*.
13. Las películas de quitosan y las de quitosan adicionadas con los tres extractos tuvieron la mejor actividad antimicrobiana contra *P. gingivalis*.
14. Las películas de pululano con *C. lechleri* y pululano con *J. adstringens* fueron las que tuvieron mejor actividad antimicrobiana contra ambas cepas de *E. coli* probadas.
15. Las pruebas de estabilidad para conocer la vida útil de cada formulación durante tres meses de pruebas indicaron que no ocurrieron cambios en las propiedades de las películas almacenadas a una humedad relativa de 60% o 25%.
16. Las pruebas de estabilidad en relación a las propiedades de las películas almacenadas a 25°C y 4°C, durante tres meses de evaluación, revelaron que la temperatura si afectó las propiedades antimicrobianas de las películas sólo sobre cepas de *E. coli* 43895.
17. En relación a la evaluación de la vida útil de las películas almacenadas bajo condiciones de luz u oscuridad, los resultados sugieren que no se afectó la actividad antimicrobiana de las formulaciones en un plazo de tres meses.
18. La actividad antimicrobiana decreció conforme pasaron los meses, independientemente de las condiciones de almacenaje.

Se puede concluir que el análisis global de los resultados mostró que las películas elaboradas de quitosan y pululano presentaron características adecuadas para su aplicación clínica como sistemas de liberación oral de drogas antimicrobianas sobre microorganismos periodontopatógenos.

Así, la aportación más relevante de este trabajo es la innovación del desarrollo de películas que pueden ser empleadas en la terapia de la enfermedad periodontal.

PERSPECTIVAS FUTURAS:

Este trabajo representa la primera etapa en la elaboración de sistemas de liberación para su uso en enfermedades orales y la propuesta para desarrollar nuevos proyectos de investigación para perfeccionar las características físicas y biológicas de las películas para ser aplicadas en odontología.

En este contexto se proponen las siguientes sugerencias:

- Análisis de cromatografía para los extractos que mostraron la mejor actividad antimicrobiana, determinar sus compuestos y la actividad de éstos.
- Caracterización mecánica de las películas de biopolímeros como su resistencia y ductilidad.
- Llevar a cabo pruebas de microscopía electrónica para el análisis de la morfología de superficie de las películas.
- Evaluación de diferentes técnicas de esterilización de las películas para ser empleadas como biomateriales.
- Realización de pruebas de citotoxicidad *in vitro*, directa e indirecta para su evaluación como biomateriales.
- Realización de ensayos en modelos animales.
- Realización de pruebas *in vivo*.

Las recomendaciones aquí expuestas se basan en las limitaciones observadas a lo largo de este proyecto, en mejorar algunos aspectos de caracterización de los biopolímeros empleados y en la necesidad de dar continuidad al presente trabajo.

6. LITERATURA CITADA

Aksungur P, Sungur A, Unal S, Iskit AB, Squier CA, Senel S. 2004. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *J. Control Release.* 98:269-279.

Alemán HME. 2006. *Estudio de las propiedades y biodegradabilidad de plásticos (cast-films) elaborados a partir de cáscara de naranja, pectina y alcohol polivinílico (PVOH)*. Tesis de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Alonso, J. 2007. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. 1a. Reimpresión corregida y renovada. Corpus Editorial y Distribuidora.

Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin sensitive neurons. *Planta Médica* 69:905–909.

Azurra A, [Barenbaum SR](#), [Bojanich MA](#), [Calamari SE](#), [Aguilar J](#), [Battellino LJ](#), [Dorransoro ST](#). 2006. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on *Candida albicans* hydrophobicity and adhesion to cells. [Med Oral Patol Oral Cir Bucal](#). 11:120-125.

Bachrach G, Altman H, Kolenbrander P, Chalmers N, Gabai-Gunter M, Mor A, Friedman M, Steinberg D. 2008. Resistance of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 to direct killing by antimicrobial peptides is protease independent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 52:638-642.

Behnia M, Haghghi A, Komeylizadeh H, Tabaei S, Abadi A. 2008. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on *in vitro* growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology.* 46:153-156.

Bhattarai N, Ramay H, Chou SH, Zhang M. 2006. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine.* 1:181–187.

Bhise K, Dhumal R, Chauhan B, Paradkar A, Kadami S. 2006. Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling, erosion, and drug release from chitosan matrices. *AAPS. Pharm Sci Tech.* 8(2). Article 44. (<http://www.aapspharmscitech.org>).

- Borris R. 1996. Natural products research: perspectives for a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*. 51:29-38.
- Burrell R, Walters J. 2008. Distribution of systemic clarithromycin to gingiva. *Journal of Periodontology*. 79:1712-1718.
- Castillo I, Rivero F, Celis H, Romero I. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 114:72-77.
- Chelladurai S, Mishra M, Mishra B. 2008. Design and Evaluation of Bioadhesive *in-Situ* Nasal Gel of Ketorolac Tromethamine. *Chem. Pharm. Bull.* 56:1596-1599.
- Clark A. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*. 13:127-132.
- Coleman DJ, McGhie D, Tebbutt GM. 1977. Further studies on the reliability of the bacitracin inhibition test for the presumptive identification of Lancefield group A streptococci. *Journal of Clinical Pathology*. 30:421-426.
- Cortelli J, Aquino D, Cavalca S, Borges C, Carvalho-Filho J, Nobre G, Oliveira F, Kawai T. 2008. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. 5:1322-1329.
- Dyer A, Hinchcliffe M, Watts P, Castile J, Jabbal I, Nankervis R, Smith A, Illum L. 2002. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 7:998-1008.
- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. 2007. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of Clinical Microbiology*. 1:3859-3869.
- Galaev I, Mattiasson B. 2008. Smart polymers. Applications in Biotechnology and Biomedicine. Second Edition. CRC Press.
- Galán Wong L. 2007. Compañías de Biotecnología Públicas y Privadas a nivel mundial. Primera edición. Editorial del Instituto de Biotecnología. pp. 18-38.
- García K. 2006. Principales usos y posibles acciones farmacológicas del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltedl). *Infármate*. Año 2. Número 7.

- Gibson F, Hong C, Chou H, Yumoto H, Chen J, Lien E, Wong J, Genco C. 2004. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *American Heart Association, Inc.* 109:2801-2806.
- Goodson J, Palys M, Carpino E, Regan E, Sweeny B, Socransky S. 2004. Microbiological changes associated with dental prophylaxis. *The Journal of the American Dental Association.* 135:1559-1564.
- Gorle A, Gattani S. 2009. Design and evaluation of polymeric ocular drug delivery system. *Chem. Pharm. Bull.* 57:914-919.
- Groppo FC, Ramacciato JC, Simoes RP, Florio FM, Sartoratto A. 2002. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *International Dental Journal.* 52:433-437.
- Guthmiller J, Lally E, Korostoff J. 2001. Beyond the specific plaque hypothesis: are highly leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a paradigm for periodontal pathogenesis?. [Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.](#) 12:116-24.
- He P, Davis SS, Illum L. 1999. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. *J. Microencapsul.* 16:343-355.
- Henderson B, Wilson M, Sharp L and Ward J. 2002. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Med. Microbiol.* 51:1013-1020.
- Hijiya H, Shiosaka M. 1975. Adhesives and pastes. US Patent 3,873,333.
- Hojo K, Tamura A, Mizoguchi C, Kato D, Ohshima T, Maeda N. 2008. Predominant bacteria recovered from a periodontitis site in a hamster model raised by silk-ligature with *Prophyromonas gingivalis* infection. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 72:1348-1351.
- Hoon Il, Yong J, Eun J, Jee Y. 2001. Antimicrobial characteristics of chitosan against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2378-2383.
- Huerta V, Mihalik K, Crixell S, Vattem D. 2008. Herbs, Spices and medicinal plants used in Hispanic traditional medicine can decrease quorum sensing dependent virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Applied Research in Natural Products.* 1:9-15.
- Jain S, Jain A, Gupta Y, Ahirwar M. 2007. Design and Development of Hydrogel Beads for Targeted Drug Delivery to the Colon. *AAPS Pharm SciTech.* 8 (3) Article 56. (<http://www.aapspharmscitech.org>).

- Jain A, Gupta Y, Jain SK. 2007. Potential of calcium pectinate beads for target specific drug release to colon. *J Drug Target*. 15:285-294.
- Javelet J, Torabinajad M, Danforth R. 1985. Isobutyl cyanoacrylate: a clinical and histologic comparison with sutures in closing mucosal incisions in monkeys. *Oral Surgery. Oral Medicine. Oral Pathology*. 59:91-94.
- Joshi K, Rimm E, Douglass C, Trichopoulos D, Ascherio A, Willet W. 1996. Poor oral health and coronary heart disease. *Journal of Dental Research*. 75:1631-1636.
- Juliano C, Cossu M, Pigozzi P, Rassu G, Giunchedi P. 2008. Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharm*. 4:1153-1158.
- Kawahara M, Mizutani K, Suzuki S, Kitamura S, Fukada H, Yui T, Ogawa K. 2003. Dependence of the mechanical properties of a pullulan film on the preparation temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 67:893-895.
- Kurita K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polym. Degrad. Stabil.*, 59:117-120.
- Kutcher M J, Ludlow J, Samuelson A, Cambell T, Pusek S. 2001. Evaluation of a bioadhesive device for the management of aphthous ulcers. *Journal of American Dental Association*. 132:368-376.
- Leathers TD. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62:468-473.
- Lee J, Yeomans W, Allen A, Deng F, Gross R, Kaplan D. 1999. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:5265-5271.
- Leung SS, Martin A, Leone RS. 2001. Bioadhesive antibacterial wound healing composition. US Patent 6:329-434.
- Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol*. 95:147-55.
- MacHugh TH, Krochta JM. 1994. Sorbitol- vs glycerol- plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42:841-845.
- Mager D, Ximenez-Fyvie A, Haffajee A, Socransky S. 2003. Distribution of selected bacterial on intraoral surfaces. *Journal of Clinical Periodontology*. 30:644-654.

- Martini FH. Fundamentals of anatomy and physiology. 1995. New Jersey, A Simon & Schuster Company, 3^a Edition, p.28.
- Matsumura Y, Satake Ch, Egami M, Mori T. 2000. Interaction of gum arabic, maltodextrin and pullulan with lipids in emulsions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1827-1835.
- Mitsuhashi M, Yoneyama M, Sakai S. 1990. Growth promoting agent for bacteria containing pullulan with or without dextran. Canadian Patent 2,007,270.
- Murphy M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12:564-582.
- Muzzarelli RAA, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Pietro E, Varaldo P. 1990. Antimicrobial Properties of N-Carboxybutyl Chitosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 10:2019-2023.
- Muzzarelli RAA. 1996. *Carbohydr. Polym.* 29:309-316.
- Muzzarelli RAA. 2009. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym.* 76:167-182.
- Navarrete A, Mata R, Delgado G. 1989. Alkylsuccinic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Médica* 55, 579.
- Navarrete A, Martínez-Urbe L.S, Reyes B. 1998. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research.* 12:1-4.
- Navarrete A, Oliva I, Sanchez M, Arrieta J, Cruz L, Castañeda G. 2005. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 57:1629-1636.
- Nisengard and Newman. 1994. *Oral Microbiology and Immunology.* Second Edition. W. B. Saunders Company.
- No HK, Lee KS, Meyers SP. 2000. Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products. *Journal of Food Science.* 65:1134-1137.
- Norskov-Lauritsen N y Kilian M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus*, and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov. comb. nov. *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor independent isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56:2135-2146.

- Nostro A, Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli M, Pizzimanti F, Cioni P, Procopio F, Blanco A. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 56:519-523.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1998.
- Olivera AG, Soto M, Martinez M, Terrazas T, Solares F. 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphitherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacology*. 68:109-113.
- Oku T, Yamada K, Hosoya N. 1979. Effects of pullulan and cellulose on the gastrointestinal tract of rats. *Nutr Food Sci*. 32:235–241.
- Okuda K, Kimizuka R, Abe S, Kato T, Ishihara K. 2005. Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. *Journal of Periodontology*. 11:2154-2160.
- Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. 2005. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, b-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55:888–896.
- Oviedo I, Ramirez T, Martinez M. 2005. Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57:1087-1091.
- Pinto E, Pina C, Salgueiro L, Goncalves M, Costa S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. *Journal of Medical Microbiology*. 55:1367–1373.
- Pinzelik J, Nisonger LL, Murray FJ. 1953. Some Variables in the Assay of Bacitracin. *Applied and Environmental Microbiology*. 1:293-296.
- Poulsen K, Ennibi O, Haubek, D. 2003. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 3:4829-4832.
- Pozzati P, Scheid L, Spader T, Atayde M, Santurio J, Alves S. 2008. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. [Canadian Journal of Microbiology](#). 54:950-956.
- Ramdas M, Dileep K, Anitha Y. 1999. Alginate encapsulated bioadhesive chitosan microspheres for intestinal drug delivery. *J. Biomater Appl*.13:290-296.

Rasooli I, Mirmostafa S. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 9:2200-2205.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science – An introduction to materials in medicine*. Academic Press, London, 1996. 484p.

Quinn J, Wells G, Sutcliffe T. 1997. A randomized trial comparing octylcyanoacrylate tissue adhesive and sutures in the management of lacerations. *The Journal of the American Medical Association*. 277:1527-1530.

Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee A, Socransky S, Uzel N, Steenberghe D. 2005. Initial subgingival colonization of “pristine” pockets. *Journal Dental Research*. 84:340-344.

San T, Sakharkar K, Lim C, Sakharkar K. 2009. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Sciences*. 5:153-160.

Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D. 2007. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. [Pharm Res](#). 24:2198-2206.

Scott N, Courtney H, Bumgardner J, Haggard W. 2008. Chitosan films. A potential local drug delivery system for antibiotics. *Clin Orthop Relat Res*. 466:1377–1382.

Sharma CP. 2001. Blood-Compatible Materials: A Perspective. *Journal of Biomaterials Applications*. 15:359-381.

Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S. 2008. Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. *Journal of Pharmacological Sciences*. 106:555-558.

Shimono N, Takatori T, Masumi T. 2002. Chitosan dispersed system for colon-specific drug delivery. *Int J Pharm*. 245:45-54.

Skiers WE. 1980. Sterilizing radiation effects on selected polymers. *Radiation Physics and Chemistry*. 15:47-57.

Slots J. 1981. Selective Medium for Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 15:606-609.

Slots J. and Genco J. 1984. Microbial Pathogenicity. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *Journal of Dental Research*. 63:412-421.

- Socransky S, Haffajee A. 1994. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology*. 5:7-25.
- Soriano-García M, Toscano RA, Ortiz B, Navarrete A, Sánchez-Obregon R, Barrios H, Yuste F. 1987. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α ,13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallography C*. 43:990-992.
- Sung B, Pandey M, Ahn K, Yi T, Chaturvedi M, Liu M, Aggarwal B. 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B α kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood*. The American Society of Hematology. 10:4880-4891.
- Tenovuo J, Lumikari M, Soukka T. 1991. Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proceedings of the Finnish Dental Society* 87:197-208.
- Tonetti MS, Schmid J. 1994. Pathogenesis of implant failures. *Periodontol* 2000. 4:127-138.
- Tozaki H, Komoike J, Tada C. 1997. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci*. 86:1016-1021.
- van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontology* 2000 1999; 20:122-135.
- Watson WH, Domínguez XA, Vázquez G, García S, 1987. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphyterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química*. 18: 89-90.
- Williams RC, Offenbacher S. 2000. Periodontal medicine. *Periodontol* 2000. 23:9-156.
- Wolf B, Garleb K, Choe Y, Humphrey P, Maki K. 2003. Pullulan is a slowly digested carbohydrate in humans. *The Journal of Nutrition*. 133:1051-1055.
- Wu Y, Yan J, Chen L, Gu Z. 2007. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. *Journal of Zhejiang University*. 8:121-131.
- Xin-Yuan S, Tian-Wei T. 2004. New contact lens based on chitosan/gelatin composites. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 19:467-479.

Yang F, Li X, Cheng M, Gong Y, Zhao N, Zhang X. 2002. Performance modification of chitosan membranes induced by gamma irradiation. *Journal of Biomaterials Applications*. 16:215-226.

Yan X, Khor E, Lim LY. 2000. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 48:941-946.

Wang DM, Wang CY, Chu CY, Yeh HM. 2000. Permeation of drug and swelling agent through polymeric membranes. *AICHE Journal*. 46:2383-2394.

Wang L, Khor E, Lim LY. 2001. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 90:1134-1142.

Wang L, Khor E, Wee A, Lim LY. 2002. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 63:610-618.

ANEXOS

RESUMEN CURRICULAR

Aída Rodríguez García

Candidata para el Grado de Doctor en Ciencias
Con Especialidad en Biotecnología

TESIS:

Elaboración de biopelículas a base de quitosan y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos periodontopatógenos

CAMPO DE ESTUDIO:

Biotecnología aplicada a Medicina

DATOS PERSONALES:

Nacida en Río Bravo, Tamaulipas el 18 de Diciembre de 1957.

Hija de: Nicolás Rodríguez y Pereyra y Olivia García Garza

EDUCACION:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Cirujano Dentista en 1980.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo Leon, grado obtenido: Especialidad en Odontología Infantil en 1990.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Maestría en Ciencias con Especialidad en Odontopediatría.

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

Maestra de teoría y clínica del Posgrado de Odontología Infantil de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León de Agosto de 1990 a Marzo del 2006.

Consulta Privada en Odontopediatría exclusivamente de 1990 a la fecha.

La presente investigación generó las siguientes publicaciones:

Aida Rodríguez-García, Luis J. Galán-Wong, Katiushka Arevalo-Niño. 2010. Development and in vitro evaluation of biopolymers as a delivery system against periodontopathogen microorganisms. *Acta Odontologica Latinoamericana* Vol. 23 N° 2. ISSN 0326-4815. 1201-1206.

I. Peixoto Teixeira Alves, J.F. Hofling, M.A. De la Garza-Ramos, L.J. Galán Wong, K. Arévalo Niño and A. Rodríguez García, 2010. In vitro tests of antifungal activity of plants used in Mexican traditional medicine. "Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products". World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. ISBN-13: 978-981-4322-10-2. 484-487.

A. Rodríguez García, L.J. Galán Wong, G. Rojas Verde, and K. Arévalo Niño. 2010. Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl against periodontopathogen microorganisms. "Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products". World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. ISBN-13: 978-981-4322-10-2. 463-467.

J. Sardi- de Cássia Orlandi, I. Peixoto- Teixeira Alves, J.F. Höfling, B. Gonçalves-Reginaldo, A. Rodríguez- García, L.J. Galán-Wong, K. Arévalo-Niño, C. Pierce and J.L. López-Ribot. 2010. Effect of plants used in Mexican traditional medicine on *Candida albicans* biofilm. "Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products". World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. ISBN-13: 978-981-4322-10-2. 476-478.

A. Rodríguez García, L.J. Galán Wong, J. Verde Star, M.S. Flores González and K. Arévalo Niño. 2010. *In vitro* evaluation of biopolymers as delivery system of plant extracts on cultures of *Porphyromonas gingivalis* and *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*. "Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products". World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. ISBN-13: 978-981-4322-10-2. 479-483.

I. Peixoto- Teixeira Alves, J. Sardi- de Cássia Orlandi, J.F. Höfling, B. Gonçalves-Reginaldo, A. Rodríguez- García, L.J. Galán-Wong, K. Arévalo-Niño, C. Pierce and J.L. López-Ribot. 2010. *In vitro* tests of biopolymers with extracts from plants used in Mexican traditional medicine on *Candida albicans* biofilm. "Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products". ISBN-13:978-981-4322-10-2.488-491.

Aída Rodríguez García, Luis J. Galán Wong, Katiushka Arévalo Niño. 2010. Elaboration and evaluation of membranes from biopolymers as delivery system of plant extracts. Materials Research Society. *Journal of Materials Research*. En revisión.

Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl against periodontopathogen microorganisms

A. Rodríguez García, L.J. Galán Wong, G. Rojas Verde, K. Arévalo Niño*

INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, Faculty of Biological Science, Autonomous University of Nuevo Leon. Ave. Pedro de Alba s/n. Ciudad Universitaria. San Nicolas de los Garza, N. L. Mexico CP. 66451.

Thymus vulgaris (Thyme), *Matricaria chamomilla* (Chamomile), *Croton lechleri* (Sangre de Drago), *Calendula officinalis* L. (Marigold), *Juliana adstringens* Schl. (Cuachalalate) are known to have antimicrobial, antiviral and antifungal activity.

In the present study we investigated the *in vitro* antimicrobial activity against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Different parts of the plants were extracted with solvents to obtain aqueous extracts. These extracts were tested *in vitro* for their antimicrobial activity against the periodontopathogens microorganisms using agar diffusion and microdilution methods. Minimum bactericidal concentration (MBC) was evaluated by measuring the absence of bacterial growth against the tested organisms and minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined from the lowest concentrations of extracts to inhibit the growth of microorganisms. Our results showed that extracts of the five plants tested have some degree of antimicrobial activity against the two microbial strains with MIC ranging from 37-250 mg/ml.

Keywords *Thymus vulgaris*; *Matricaria chamomilla*; *Croton lechleri*; *Calendula officinalis* L.; *Juliana adstringens* Schl.; antimicrobial activity; *Porphyromonas gingivalis*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

1. Introduction

Periodontal disease is a chronic inflammatory disease of the periodontium that leads to erosion of the attachment apparatus and supporting bone for teeth and is one of the most frequently occurring infectious diseases in humans. *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (formerly *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), are among the principal microorganisms associated with the process [1].

Due to the increased drug resistance and the secondary effects of some antibiotics and mouthwashes like chlorhexidine, used in the treatment of periodontitis, justify the use of natural sources like the plant extracts as other alternative of dental treatment. Aqueous extracts from various plants are used in Mexican traditional medicine on some microorganisms associated with human infections. Thyme, chamomile, marigold, cuachalalate and sangre de drago have been used for their antimicrobial properties [2].

The chemical composition of plants and natural products, quality of the extract, content and concentration varies depending on several factors, such as botanical species, used chemotypes, the anatomical part of the plant used (seed, flower, root, leaf), extraction method, the season of the year while they are collected, sun, humidity, type of ground, storage, etc. This variability can result in significant differences in pharmacological activity: involving both pharmacodynamic and pharmacokinetic issues.

Plants have the ability to synthesize aromatic substances and secondary metabolites as phenols, terpenoids, quinones, tannins. These compounds serve as plant defense mechanisms against predation by microorganisms, insects, and herbivores. Some, are responsible for plant pigment, others give plants their odor or flavor, and some of the same herbs and spices used by human to season food yield useful medicinal compounds.

The objective of the present study was evaluate the antimicrobial properties of the aqueous extracts of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl. on planktonic cultures of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

* Corresponding author: e-mail: karevalo@fcb.uanl.mx , Phone: (+52 81) 8329- 4110

1.1 Thyme

Thymus vulgaris (garden thyme) is a small shrubby plant with a strong, spicy taste, and odor. This plant is indigenous to the Mediterranean region of Europe and is extensively cultured in different countries. Known primary constituents of the thyme include essential oil (borneol, carvacrol, cymol, linalool, and thymol), tannin, flavonoids (apigenin and luteolin), saponins, and triterpenic acids.

Essential oil and extracts from fresh leaves and flowers can be used as aromatic additives in foods, pharmaceuticals, and cosmetics. *T. vulgaris* has antispasmodic, carminative, diaphoretic, expectorant, and sedative properties. As a tincture, extract, or infusion, thyme is frequently used in throat and bronchial problems, including acute bronchitis, laryngitis, and whooping cough, and also for diarrhoea, chronic gastritis, and loss of appetite [3,4].

1.2 Chamomile

Matricaria chamomilla is a widely recognized herb in Western culture. Its medicinal usage dates back to antiquity where such notables as Hippocrates, Galen, and Asclepius made written reference to it. A common ingredient today in herbal teas because of its calming, carminative, and spasmolytic properties, it is also a popular ingredient in topical health and beauty products for its soothing and anti-inflammatory effects on skin. Chamomile has a sweet, grassy, and lightly fruity aroma. Its flowers are daisy-like, with yellow centers (approximately 1-1.5 cm in diameter) and white petals (between 12-20 in number). It is from the plant's fresh and dried flower heads that infusions, liquid extracts, and essential oils are made. Several pharmacological actions have been documented for German chamomile, based primarily on *in vitro* and animal studies. Such actions include antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antispasmodic, anti-ulcer, antiviral, and sedative effects. The constituents of chamomile thought to have antimicrobial properties include alpha-bisabolol, luteolin, quercetin, and apigenin. Herniarin may also have antibacterial and antifungal properties in the presence of ultraviolet light. Preliminary *in vitro* studies on the antimicrobial activity of chamomile have yielded promising results. Chamomile oil, at a concentration of 25 mg/mL, demonstrates antibacterial activity against such gram-positive bacteria as *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Streptococcus salivarius*, as well as some fungicidal activity against *Candida albicans* [5, 6].

1.3 Marigold

Calendula officinalis L. known as calendula or Marigold is an European plant with a bright yellow and orange flower that belongs to Asteraceae family. It's well acclimatized in Brazil, where it is cultivated as an ornamental plant and to produce drugs by pharmaceutical industry. It is a phytotherapeutic plant rich in biologically active metabolites, like sesquiterpens [7], alcohol, saponins [8], triterpens, flavonoids, hydroxycoumarin, carotenoids [9] tannin, and volatile oils (0.1-0.2%). These components confer antiseptic action, anti-inflammatory, anti-edematous, immunomodulatory activity and antimicrobial effects.

1.4 Sangre de Drago

Croton lechleri is a large tree that grows in South America, in the upper Amazon where the majority of the field research has taken place. A dark red resin, from which the name sangre de drago derives, flows easily from cuts in the bark and is used fresh or processed into a powdered dry extract of the resin for medicinal purposes. In traditional medicine sangre de drago is used for the treatment of wounds and irritations but also for a wide variety of illnesses, including respiratory infections, symptoms of cold and flu, diarrhoea, rheumatism, tonsillitis, enhanced fertility (and contraception), tuberculosis, hemorrhoids, herpes lesions [10].

The chemical composition of includes a considerable number of compounds including several simple phenols and diterpenes, proanthocyanidins, phytosterols, [11] a dihydrobenzofuran lignan, [12] and the alkaloid taspine [13]. One of the most interesting hits in this screen was taspine is a topoisomerase, an alkaloid from the cortex of the tree, an inhibitor which is active on cells overexpressing drug efflux transporters [14].

1.5 Cuachalalate

Juliana adstringens is an endemic plant of Mexico and belongs to the Julianiaceae family. It is a resinous and dioecious plant and is a medicinal plant commonly used in Mexico for the treatment of hypercholesterolemia, gastritis, fevers, gastric ulcers and gastrointestinal cancer [15,16] and also have anti-inflammatory activity [17]. Its principal compounds are masticadienonic acid; 3 α -hydroxymasticadienonic acid; 3-epi-oleanolic; as well as the sterol beta-sitosterol [18, 19]. The stem bark also showed higher amounts of triterpenes.

2. Material and Methods

Porphyromonas gingivalis ATCC33277 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 strains were previously inoculated on plates of trypticase agar (Difco, Detroit, Michigan, USA) and Brain Heart Infusion agar (Difco, Detroit, Michigan, USA). The plates were incubated at 37°C for 24 hours in anaerobiosis for *P. gingivalis* and 5% CO₂, for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. After the period of incubation, standardized suspensions were obtained in 10 mL of sterile PBS and adjusted at 0.5 McFarland standard turbidity.

Aqueous extracts of *Thymus vulgaris* (thyme), *Matricaria chamomilla* (chamomile), *Croton lechleri* (sangre de drago), *Calendula officinalis* L. (marigold), *Juliana adstringens* Schl. (cuachalalate) were used for their compounds that have antimicrobial properties.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extracts was probed on *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* cultures and determined by microdilution method using 96 well plates. The extracts were dissolved in trypticase and brain heart infusion broth and then serial two and three-fold were made. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μ L of each dilution into double well and adding 100 μ L of the inoculum. The final volume in each well was 200 μ L. Two wells were left with 200 μ L of media, two more with 200 μ L of inoculum (growth control) and two with 200 μ L of chlorhexidine (as positive control). The plates were incubated at 35°C by 24 hours according to the requirements of oxygen for each strain. The MIC was determined from the lowest concentration of extracts to inhibit the growth of microorganisms. Inhibition of proliferation was assessed by optical density measurements (625 nm). For MBC, inoculum from clear wells was resuspended in PBS to give a standard concentration of cells (1×10^8) and 10 μ L were inoculated into Petri dish pouring molten trypticaseine or brain heart infusion agar. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 hours in anaerobiosis and 5% CO₂ atmosphere conditions. Absence of bacterial growth denoted on the solid medium was considered to be indicative of bactericidal activity of the extracts. All assays and controls were performed three times in triplicate.

3. Results and Discussion

Antimicrobial properties of several plants have been investigated as alternatives with low toxicity for the prevention and treatment of infectious diseases. *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl. present components like tymol, carvacrol, alpha-bisabolol, luteolin, triterpenes, vegetal steroids, phenolic compound, glicosids, tanin and flavonoids. These compounds may be related to its microbial activity [19].

The results obtained on the inhibitory activity of the different concentrations of *T. vulgaris*, *M. chamomilla*, *C. lechleri*, *C. officinalis* L., *J. adstringens* Schl. against the tested strains can be observed in Figure 1. Our results show that minimal inhibitory concentration (MIC) of *J. adstringens* Schl. was 37 mg/mL for *P. gingivalis* and the same concentration of *C. lechleri* for *A. actinomycetemcomitans*. MIC of *T. vulgaris* and *M. chamomilla* were 62.5mg/mL for both strain, since *C. officinalis* L. was 62.5 mg/mL for *P. gingivalis* and 250mg/mL for *A. actinomycetemcomitans*.

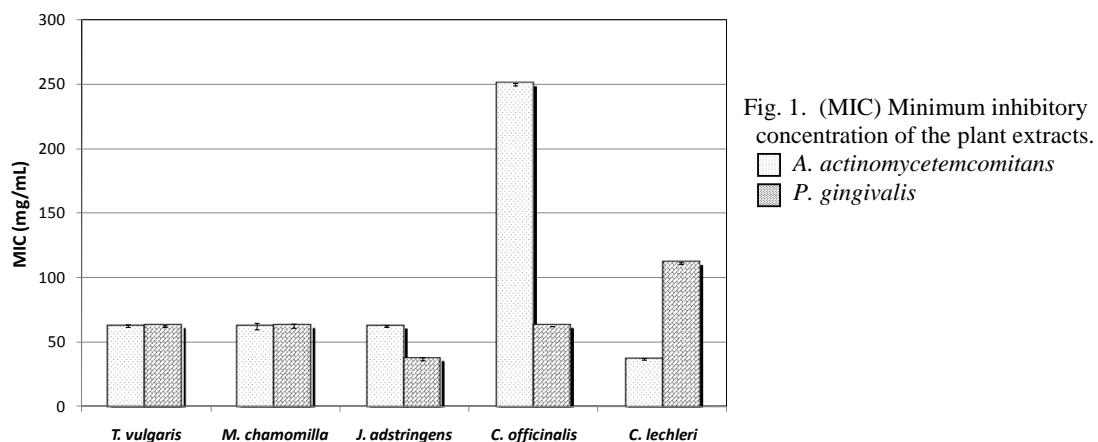
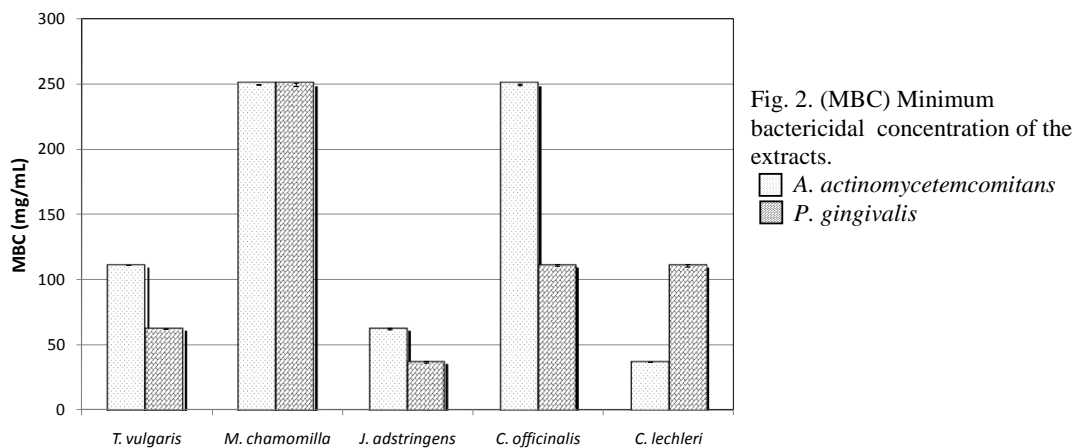


Figure 2 shows the minimum bactericidal concentration. In the present study, the MBC value of *J. adstringens* and *C. lechleri* was registered at 37 mg/mL for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* respectively. Concentrations of 62.5 mg/mL of *T. vulgaris* for *P. gingivalis* and *J. adstringens* for *A. actinomycetemcomitans* were necessary. MBC of *T. vulgaris* were 111mg/mL for *A. actinomycetemcomitans* and *C. lechleri* for *P. gingivalis*. *M. chamomilla* required higher concentrations (250mg/mL) for both microorganisms. MBC of *C. officinalis* was 250mg/mL for *A. actinomycetemcomitans* and 111mg/mL for *P. gingivalis*.



4. Conclusions

Data on the antimicrobial activity on pathogens are important for the future application of these plants in medicine and dentistry specially for *J. adstringens* that showed the best result. This is an endemic plant of Mexico which is in danger of extinction. Our results showed that extracts of the five plants tested have some degree of antimicrobial activity against the two microbial strains with MIC ranging from 37-250mg/ml. More detailed studies must be developed on the identification of chemical compounds of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl. and the correlation with the antimicrobial activity.

Acknowledgements We are thankful to MC. Ismael Malagon for statistical assistance. We also thank Vilma Suarez for technical support.

References

- [1] Socransky S. Relationship of Bacteria to the Etiology of Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*. 1970;49: 203-222.
- [2] Alonso, J. 2007. Tratado de fitofármacos y neutraceuticos. 1a. Reimpresion corregida y renovada. Corpus Editorial y Distribuidora.
- [3] Behnia M, Haghighi A, Komeylizadeh H, Tabaei SJ, Abadi A. Inhibitory Effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on in Vitro Growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology*. 2008; Vol. 46, No. 3:153-156.
- [4] Leung AY, Foster S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics. 2nd ed. New York, USA. John Wiley & Sons. 1996.
- [5] *European Pharmacopoeia*. 5th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. 1996;1976-1977.
- [6] Berry M. The chamomiles. *Pharmacology Journal*. 1995; 254:191- 193.
- [7] Marukami T, Kishi A, Yoshikawa M. Medicinal Flowers. IV.1) Marigold. (2): Structures of New Ionone and Sesquiterpene Glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 2001;Vol. 49, No. 8: 974-978.
- [8] Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H. Medicinal Flowers. III.1) Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 2001;49(7): 863-870 .
- [9] Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, Ohmiya A. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.) . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005;69(11): 2122-2128.
- [10] Conte, L. A. (1996). Shaman Pharmaceuticals' approach to drug development. In M. J. Balick, E. Elisabetsky, & S. A. Laird (Eds.), *Medicinal resources of the tropical forest: Biodiversity and its importance to human health* (pp. 94-100).NewYork: Columbia University Press.
- [11] Chen Z, Cai Y, Phillipson J. Studies on the antitumor, antibacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Med.* 1994; 60:541-545.
- [12] Pieters L, de Bruyne T, Claeys M, et al. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. *J Nat Prod.*1993;56:899-906.
- [13] Vaisberg A, Milla M, Planas M, et al. Taspine is the cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Med.* 1989;55:140-143.
- [14] Fayad W, Frykna M, Brnjic S, Olofsson M, Larsson R, Linder S. Identification of a Novel Topoisomerase Inhibitor Effective in Cells Overexpressing Drug Efflux Transporters www.plosone.org. Accessed October 1, 2009 | Volume 4 | Issue 10 | e7238. Pages 1-8.
- [15] Olivera Ortega AG, Soto Hernandez M, Martinez Vazquez M, Terrazas Salgado T, Solares Arenas F. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphitherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J Ethnopharmacol.* 1999;68:109-113.
- [16] Acevedo HR, Rojas MD, Arceo SD, et al. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res.* 2006;609: 43-46.
- [17] Oviedo Chavez I, Ramirez Apan T, Soto Hernandez M, Martinez Velazquez M. Principles of the bark of *Amphitherygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine.* 2004;11(5): 436-445.
- [18] Navarrete A, Avula B, Joshi VC, Ji X, Hersh P, Khan IA. Quantitative determination of triterpenes from *Amphitherygium adstringens* by liquid chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations. *Journal - Association of Official Analytical Chemists Int.* 2006;89(1): 1-7.
- [19] Cowan, M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology.* 1999;12:4:564-582.

Effect of plants used in Mexican traditional medicine on *Candida albicans* biofilm

J. Sardi- de Cássia Orlandi¹, I. Peixoto- Teixeira Alves¹, J.F. Höfling¹, B. Gonçalves-Reginaldo¹, A. Rodríguez- García², L.J. Galán-Wong², K. Arévalo-Niño², C. Pierce³, J.L. López-Ribot³

¹ UNICAMP. Microbiology, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, , Sao Paulo, Brazil.

² INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, Faculty of Biological Science, Autonomous University of Nuevo Leon México. Ave. Pedro de Alba s/n. Ciudad Universitaria. San Nicolas de los Garza, N. L. Mexico CP. 66451.

³ DEPARTMENT OF BIOLOGY and South Texas Center for Emerging Infectious Diseases, The University of Texas at San Antonio, Texas, USA.

Candidiasis is an increasing health threat to immune compromised individuals and infections are commonly associated with the formation of biofilms on the surfaces of biological and inert surfaces. Due to the increased drug resistance and lack of effective antifungals for the treatment of *Candida* infections, screening plant extracts for antimicrobial activity is a potential means of identifying new antifungal agents. The objective of these experiments was to determine if plant extracts from *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. are effective in the inhibition of *Candida albicans* biofilm formation.

Keywords *Candida albicans*; biofilms; antifungals; *Thymus vulgaris*; *Croton lechleri*; *Juliana adstringens* Schl.

1. Introduction

During recent years the *Candida* species, have become one of the most common agents of hospital-acquired infections [1, 2].

C. albicans is an opportunistic pathogenic fungus and is the most frequent causative agent of candidiasis.

Biofilm formation is now widely considered one of the major virulence attributes of *C. albicans* and a key contributing factor to unacceptably high mortality rates associated with candidiasis.

Candida albicans biofilm typically consist of an intricate network of yeasts and hyphae within ramifying water channels and are encased within exopolymeric material that exhibit rather complex 3D architecture, likely indicative of a high degree of specialization, adhesive interactions and quorum-sensing mechanisms in biofilm formation [3].

Quorum sensing (QS) involves the secretion by individual cells of ‘signaling’ molecules. When the local concentration of these molecules has reached a threshold, the cells respond by switching on particular genes. In this way individual cells can sense the local density of bacteria, so that the population as a whole can make a coordinated response [4].

Recently there has been an unacceptably high increase in antifungal drug resistance, particularly in *Candida albicans*.

One of the most important characteristics of biofilms is a high level of resistance to antimicrobial drugs, which can be greater than planktonic cells. Biofilms of *C. albicans* have been shown to be resistant to the azole drugs and amphotericin B [5]. As a consequence, new antifungal agents are needed, especially those that are effective against biofilms. Plant derived antimicrobials have been shown to inhibit microbial biofilm production and some of them are proved to be active in treating fungal biofilms [6].

Mexico has a great wealth of medicinal plants and it has been popular tradition to use these plants for scientific investigation, many of which deal with the antimicrobial properties of the plant extracts and their potential as a clinically relevant antimicrobial therapy.

Aqueous extracts of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. were tested in vitro for their antifungal activity against *C. albicans* using a 96-well microtiter plate model of *C. albicans* biofilm formation and inhibition.

The objective of these experiments was to determine the effect of aqueous extracts of three plants on *Candida albicans* biofilm formation.

* Corresponding author: e-mail: aidrod@hotmail.com, Phone: (+52 81) 8315- 1694

2. Material and methods

Depending of the plant, different parts of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. were collected and extracted with solvents to obtain aqueous extracts. The extracts were filtered with filters role of Whatman Ltd., sterilized by filtration by 0.22 μm Millipore filters Durapore $\text{\textcircled{R}}$ GV and stored in sterile amber bottles.

C. albicans SC5314 strain was used during the course of this study. It was stored on Sabouraud dextrose agar plates at 4°C until its use. Amphotericine B was used as positive control.

Batches of medium (20 ml YPD) were inoculated from Sabouraud agar plates containing freshly grown *C. albicans*, and incubated overnight in an orbital shaker at 30°C. Cells were harvested and washed in sterile phosphate buffered saline (PBS [Sigma, St Louis, MO]) prior to use.

Biofilms were formed in the wells of microtiter plates as essentially described previously [7].

The cells were then suspended in RPMI 1640 medium, counted and adjusted to the desired cell density (1.0×10^6 cells/mL) and performing in each well of 96-well microtiter plate.

For the first assay, biofilms were formed by pipetting 100 μL of the standardized cell suspensions into 96-well microtiter plates (Corning Incorporated, Corning, NY, U.S.A.) and adding 100 μL of each plant extract to selected wells by making 2-fold serial dilutions in RPMI 1640 and incubating the plate for 24 hours at 37°C.

After biofilm formation, the medium was discarded and nonadherent cells were removed by washing the biofilms three times in sterile PBS.

Other assay consisted in add the plant extracts 24h after the formation of biofilms. The biofilms were then incubated for 24 h. Untreated biofilms containing RPMI 1640 were included to serve as negative controls for each isolate. The antifungal effects were monitored by using a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5 sulfophenyl)- 2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) reduction assay as previously described. A 100 μL aliquot of XTT-menadione was then added to each well. The microtiter plates were covered with aluminum foil and incubated in the dark for 2 hours at 37 °C. The colorimetric change (a reflection of the metabolic activity of cells within the biofilm) was measured in a microtiter plate reader at 490 nm. The experiment was performed in triplicate.

3. Results and discussion

Aqueous extracts of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. was evaluated for antifungal properties with broth microdilution method against *Candida albicans* SC5314 biofilm.

Plant extracts were used to treat adherent cell populations with different concentrations (0.005to 4 mg/mL) to determine the inhibitory activity against *C. albicans* biofilms. *T. vulgaris* exhibited low activity against formation of *C. albicans* biofilm and in biofilm preformed 24h before. As shown in Fig. 1, this low inhibitory activity of the plant extracts was even in concentration of 4 mg/mL.

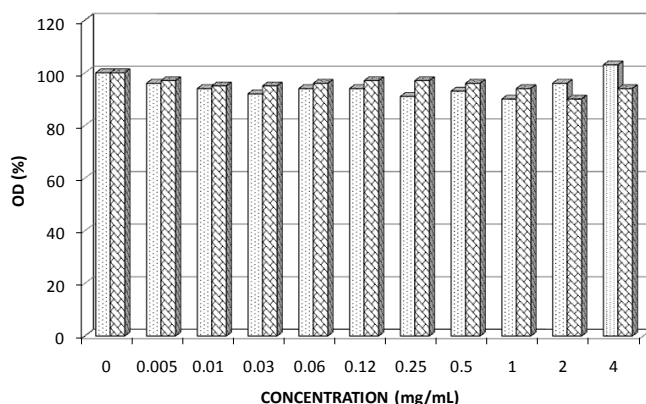


Fig. 1. Inhibitory activity of *T. vulgaris* on *Candida albicans* biofilm formation.
□ Biofilm formed in presence of plant extract.
▨ Biofilm preformed 24h before add the extract.

2. Material and methods

Depending of the plant, different parts of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. were collected and extracted with solvents to obtain aqueous extracts. The extracts were filtered with filters role of Whatman Ltd., sterilized by filtration by 0.22 μm Millipore filters Durapore $\text{\textcircled{R}}$ GV and stored in sterile amber bottles.

C. albicans SC5314 strain was used during the course of this study. It was stored on Sabouraud dextrose agar plates at 4°C until its use. Amphotericine B was used as positive control.

Batches of medium (20 ml YPD) were inoculated from Sabouraud agar plates containing freshly grown *C. albicans*, and incubated overnight in an orbital shaker at 30°C. Cells were harvested and washed in sterile phosphate buffered saline (PBS [Sigma, St Louis, MO]) prior to use.

Biofilms were formed in the wells of microtiter plates as essentially described previously [7].

The cells were then suspended in RPMI 1640 medium, counted and adjusted to the desired cell density (1.0×10^6 cells/mL) and performing in each well of 96-well microtiter plate.

For the first assay, biofilms were formed by pipetting 100 μL of the standardized cell suspensions into 96-well microtiter plates (Corning Incorporated, Corning, NY, U.S.A.) and adding 100 μL of each plant extract to selected wells by making 2-fold serial dilutions in RPMI 1640 and incubating the plate for 24 hours at 37°C.

After biofilm formation, the medium was discarded and nonadherent cells were removed by washing the biofilms three times in sterile PBS.

Other assay consisted in add the plant extracts 24h after the formation of biofilms. The biofilms were then incubated for 24 h. Untreated biofilms containing RPMI 1640 were included to serve as negative controls for each isolate. The antifungal effects were monitored by using a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5 sulfophenyl)- 2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) reduction assay as previously described. A 100 μL aliquot of XTT-menadione was then added to each well. The microtiter plates were covered with aluminum foil and incubated in the dark for 2 hours at 37 °C. The colorimetric change (a reflection of the metabolic activity of cells within the biofilm) was measured in a microtiter plate reader at 490 nm. The experiment was performed in triplicate.

3. Results and discussion

Aqueous extracts of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. was evaluated for antifungal properties with broth microdilution method against *Candida albicans* SC5314 biofilm.

Plant extracts were used to treat adherent cell populations with different concentrations (0.005to 4 mg/mL) to determine the inhibitory activity against *C. albicans* biofilms. *T. vulgaris* exhibited low activity against formation of *C. albicans* biofilm and in biofilm preformed 24h before. As shown in Fig. 1, this low inhibitory activity of the plant extracts was even in concentration of 4 mg/mL.

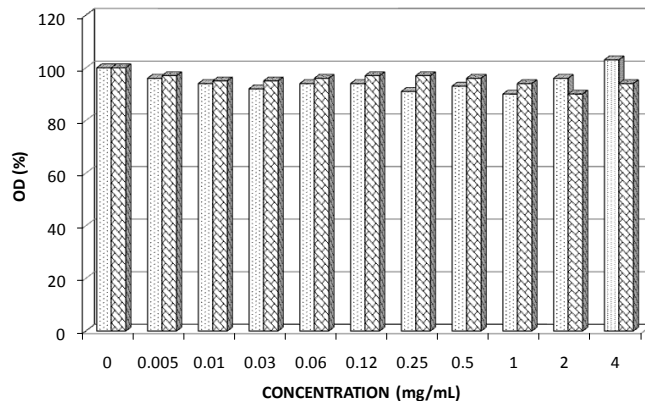


Fig. 1. Inhibitory activity of *T. vulgaris* on *Candida albicans* biofilm formation.
□ Biofilm formed in presence of plant extract.
▨ Biofilm preformed 24h before add the extract.

C. lechleri exhibited low activity against formation of *C. albicans* biofilm and in biofilm preformed 24h before add the extract (Fig. 2).

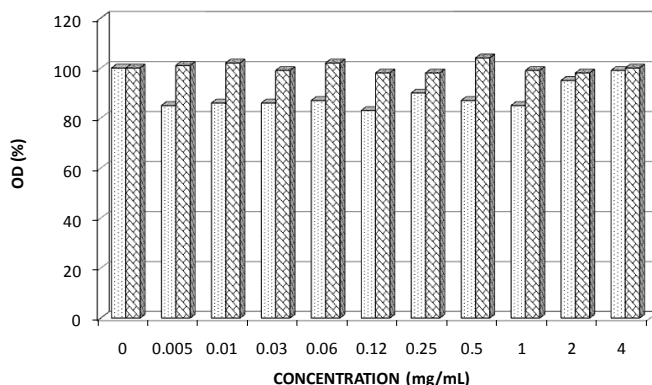


Fig. 2. Inhibitory activity of *C. lechleri* on *Candida albicans* biofilm formation.
 □ Biofilm formed in presence of plant extract.
 ▨ Biofilm preformed 24h before add the extract.

After 24 h incubation, *C. albicans* had an inhibition of biofilm formation by 88.25% when *J. adstringens* extract was added to the medium, at concentrations of 0.12mg/mL and low activity in biofilm preformed 24h before add the extract (Fig. 3).

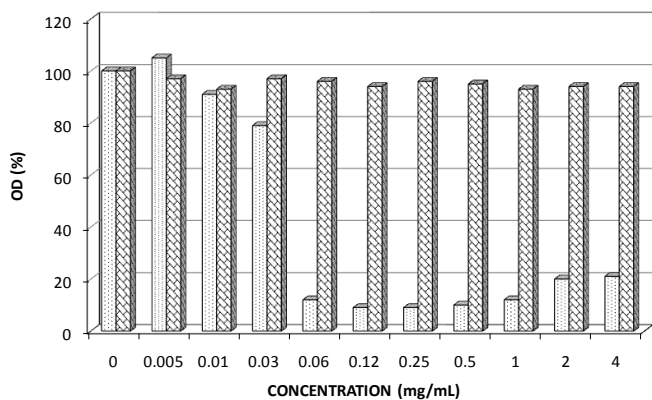


Fig. 3. Inhibitory activity of *J. adstringens* on *Candida albicans* biofilm formation.
 □ Biofilm formed in presence of plant extract.
 ▨ Biofilm preformed 24h before add the extract.

4. Conclusions

These findings suggested that *T. vulgaris* and *C. lechleri* have low activity on the formation of biofilm while *J. adstringens* displayed strong antifungal activities against *C. albicans* biofilm formation. When preformed biofilms were exposed to all the plant extracts, none of them had antifungal effects on preformed *C. albicans* biofilms.

References

- [1] Al-Fattani M. A., Douglas L. J. Penetration of Candida biofilms by antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:3291-3297.
- [2] Wilson, L. S., C. M. Reyes, M. Stolpman, J. Speckman, K. Allen, and J. Beney. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health.* 2002;5:26–34.
- [3] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriology.* 2001;83:5385-5394.
- [4] Tama's Cza' ra'n1*, Rolf F. Hoekstra. Microbial Communication, Cooperation and Cheating: Quorum Sensing Drives the Evolution of Cooperation in Bacteria. *PLoS ONE.* 2009;4(8)e6655.:1-10.
- [5] Baillie G. S., Douglas L. J. Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;46(3):397-403.
- [6] Ramage G., Saville S. P., Wickes B. L., Lopez-Ribot J. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;68(11): 5459-5463.
- [7] Ramage G., Walle K. V., Wickes B. L., López-Ribot J. L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 200. 45(9): 2475—2479 Raux H, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing. *Virology.* 1995;210:400-408.

In vitro evaluation of biopolymers as delivery system of plant extracts on cultures of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. Rodríguez García¹, L.J. Galán Wong¹, J. Verde Star¹, MS. Flores González¹, K. Arévalo Niño^{1*}

¹ INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, Faculty of Biological Science, Autonomous University of Nuevo Leon. Ave. Pedro de Alba s/n. Ciudad Universitaria. San Nicolas de los Garza, N. L. Mexico CP. 66451.

Periodontal disease is an infectious and inflammatory process that affects the periodontium including the gingiva, gingival attachment, periodontal ligament, cementum and supporting alveolar bone, and is the major cause of tooth loss in adults. *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, have been identified as causative agents. Therapy includes oral hygiene education, instrumentation for removal of calculus (scaling), chemotherapy and periodontal surgery. At recent years, the use of natural sources like plant extracts and biomaterials as chitosan and pullulan are enjoying great popularity.

The aim of this work was the use of biotechnology in the development of a local delivery system for the treatment of periodontal disease evaluating antimicrobial activity of two natural polymers (chitosan and pullulan) added with aqueous extracts of *T. vulgaris*, *C. lechleri* and *J. adstringens* Schl. against *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, the most frequent causative agents of periodontitis.

Keywords Biopolymers; plant extracts; antimicrobial activity; *Porphyromonas gingivalis*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

1. Introduction

Gingivitis and periodontitis are the most common periodontal diseases. Like other infections, the bacterial-host interactions determine the nature of the resulting disease. The pathologic microorganisms may produce disease indirectly through the effect of their toxins or by direct invasion of tissues. The host response to microorganisms can be protection, destruction or both depending on the variety of changes in the tissues observed in patients. In general, anaerobic gram negative microorganisms [1, 2, 3] are the principal bacteria associated with most bacterial caused periodontal diseases. Bacteria commonly identified with this disease are: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [4]. Several agents are commercially available, these chemicals can alter oral microbiota and have undesirable side-effects such as vomiting, diarrhoea and tooth staining.

Currently there has been an increase in demand for drugs from natural products without adverse effects on health, effective and economical. The use of plant extracts, as well as other alternative forms of medical treatments, is enjoying great popularity [5].

Aqueous extracts from various plants are used in Mexican traditional medicine on some microorganisms associated with human infections. *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. have shown antimicrobial, antifungal and anti-inflammatory activities.

The use of new biotechnology tools in the development and implementation of renewable materials derived from the metabolism of some microorganisms or products present in plants or animals as chitosan and pullulan makes them attractive for its availability, biodegradability and biocompatibility and also allow to add them certain materials or drugs for their use in medicine as vehicles in the controlled release of active principles of plant extracts.

Chitosan and pullulan are polysaccharide biopolymers that combine a unique set of versatile physicochemical and biological characteristics which allow for a wide range of applications, including biodegradability, biocompatibility and nontoxicity. Biocompatibility of a biomaterial refers to the extent to which the material does not have toxic or injurious effects on biological systems.

One of the present trends in biomedical research requires materials that are derived from nature as natural materials have been shown to exhibit better biocompatibility with humans.

Chitin is a N-acetylated polymer of D-glucosamine widely distributed in nature. It is commonly found in the shells of crabs, shrimps and arthropods as well in the walls of fungi cells [6]. The form deacetylated (chitosan) has many applications such as producing biodegradable film in waste water treatment, controlled release of drugs and as food additives.

* Corresponding author: e-mail: karevalo@fcb.uanl.mx , Phone: (+52 81) 8329- 4110

Studies on chitosan have been intensified since 1990 due to its low cytotoxicity, antimicrobial activity and excellent biodegradable properties in the human body, where these have contributed to the better biocompatibility of chitosan [7,8].

Pullulan is a neutral linear polysaccharide composed of (1→6)-linked α -D-maltotriose residues synthesized from starch or sugar by *Aureobasidium pullulan* [9]. Its unique linkage pattern is believed to be responsible for the structural flexibility and solubility of pullulan, resulting in distinct film- and fiber-forming characteristics not exhibited by other polysaccharides. It is highly water-soluble and forms an edible film which is colorless and tasteless [10, 11, 12]. Pullulan and its derivatives exhibit adhesive properties and can be used in wound-healing compositions [13]. Oral care products based on pullulan films have recently been commercialized as a denture adhesive and refreshing breath strips.

2. Material and Methods

2.1 Bacteria Growth conditions

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 were activated in trypticase broth soy and brain heart infusion in the anaerobic chamber and incubated at 35°C for 48 hours in anaerobic and 5% CO₂ atmosphere conditions respectively. For long-term storage, strains were made on glycerol stocks.

2.2 Plant material

Different parts of the plants of *Thymus vulgaris* (thyme), *Croton lechleri* (sangre de drago) and *Juliana adstringens* Schl.(cuachalalate) were collected and extracted with hydroalcoholic solvents to obtain aqueous and organic extracts.

The extracts were filtered with filters of Whatman Ltd., sterilized by filtration by 0.22 μ m Millipore filters Durapore @ GV and stored in sterile amber bottles. To evaluate the antimicrobial activity of each extract, 1:2 and 1:3 dilutions were prepared and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution technique NCCLS M11 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997).

2.3 Antimicrobial activity

In vitro antimicrobial activities of aqueous extracts of *T. vulgaris*, *C. lechleri*, and *J. adstringens* Schl and chlorhexidine 0.12 % (as positive control) were evaluated against *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by microdilution method using 96 well plates. The inoculum was prepared and adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity. The correct turbidity density was measured at 540nm using a spectrophotometer.

All the extracts dissolved in trypticase and brain heart infusion broth (for *P. gingivalis* and *A. Actinomycetemcomitans* respectively) and then serial two-three fold dilution were made. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μ L of each dilution into double well and adding 100 μ L of the inoculum. The final volume in each well was 200 μ L. Two wells were left with 200 μ L of media, two more with 200 μ L of inoculum and two with 200 μ L of chlorhexidine (as control). The plates were incubated at 35°C by 24 hours according to the requirements of each strain. The MIC was determined from the lowest concentration of extracts to inhibit the growth of microorganisms. Inhibition of proliferation was assessed by optical density measurements (625 nm).

For minimum bactericidal concentrations (MBC), inoculum from clear wells was resuspended in PBS to give a standard concentration of cells (1×10^8) and 10 μ L were inoculated into Petri dish pouring molten trypticaseine or brain heart infusion agar to 45-50°C and swirled to distribute the medium homogeneously. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 hours in anaerobiosis and 5% CO₂ atmosphere conditions. Absence of bacterial growth noted on the solid medium was considered to be indicative of bactericidal activity of the extracts. All assays and controls were made three times in triplicate.

2.4 Preparation of the polymers

Chitosan with deacetylation degree 85% was purchased from Sigma Chemical CO. St. Louis MO. USA. Pullulan (molecular weight=200,000) was donated by Hayashibara Company (Okayama, Japan).

Three different formulations of each biopolymer were tested to obtain the best properties for the production of films. 1.0, 1.2 and 0.8 g of chitosan power were dissolved in 100mL1% (vol/vol) acetic acid aqueous solution for a final concentration of 1%, 1.2% and 0.8%.

Pullulan was used at 10%, 12% and 10% , plus sorbitol (as plasticizer) and bidestilled water.

The average pH was 3.9 for chitosan and 5.7 for pullulan. The best formulation for each biopolymer were selected and added to predetermined amounts of plant extracts: 80mg/mL of *T. vulgaris*, 60mg/mL *J. adstringens* Schl and 90 mg/mL *C. lechleri* and stirred until the mixture became homogeneous.

The method used was "casting", pouring the formulation into acrylic molds (board), spreading the mixture with a spoon and drying at room temperature. Films were recovered manually after 24 hours. Once recovered, the films were cut with a 6 mm diameter drill and stored at 25°C and 25% relative humidity until they were used.

2.5 Antimicrobial activity by disc diffusion assay

The discs (6 mm in diameter) of biopolymers with the added extracts where applied by pressing slightly on the solid trypticase and brain heart infusion agar medium inoculated with 1 µL of bacterial suspension (10^8 CFU/mL) of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*. One disc impregnated with chlorhexidine was used as positive reference in each plate. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 hours in anaerobiosis and 5% CO₂ atmosphere conditions. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zones formed on the media in millimeters with a ruler. All inhibition assays and controls were repeated three times with each test conducted in duplicate. The collected data were analyzed by descriptive statistics ANOVA test using SPSS 17.0 software. The results were presented as mean ±S.D. Statistical significance was accepted at the p<0.05 level.

3. Results and Discussion

Periodontal diseases are the most frequent infections in humans. *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are among the microorganisms commonly identified with the process [4]. Increasing resistance to drugs and the side effects of some antibiotics and mouthwashes such as chlorhexidine, used in the treatment of periodontitis, the new biotechnology tools and the antimicrobial activity of some plants, justify the development of novel options as alternative of dental treatments.

In this work we probed the antimicrobial activity of two biopolymers (chitosan and pullulan) added with aqueous extract of *T. vulgaris*, *J. adstringens* Schl. and *C. lechleri* on cultures of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* using the disc diffusion method.

Other studies shown that the exposure of *A. actinomycetemcomitans* to the chitosan resulted in the disruption of cell membranes and that it could be considered for the treatment of periodontal diseases [15].

Previous works indicate that chitosan and pullulan have certain *in vitro* antibacterial activity [16].

Plant extracts used in different countries as tradicional medicines have been studied extensively [14]. Some of they showed antimicrobial activity against oral pathogens as *A. actinomycetemcomitans* [17].

The inhibition zones formed by biopolymers chitosan and pullulan added with aqueous extracts of *T. vulgaris*, *J. adstringens* Schl. and *C. lechleri*, on *A. actinomycetemcomitans* cultures are shown in Figure 1.

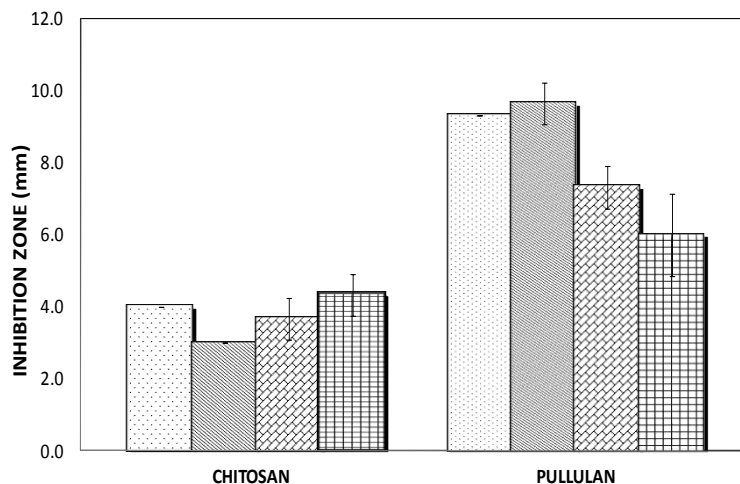


Fig. 1. Antimicrobial activity of the biopolymers with extracts on *A. actinomycetemcomitans*.

□ Polymer (Control)
■ Polymer- *T. vulgaris*
▨ Polymer- *J. adstringens*
▩ Polymer- *C. lechleri*

As can be seen from Figure 1, the extracts of chitosan without extract showed inhibition zones of 4.5 mm, 4 mm the polymer with *T. vulgaris*, 4.3 mm for *J. adstringens* Schl. and 6 mm for *C. lechleri*. Pullulan biopolymers added with *T. vulgaris* showed zones of growth inhibition about 9.6 mm of diameter, 7.3 mm for *J. adstringens* Schl., 6mm for *C. lechleri* while 9.3 for Pullulan without extracts.

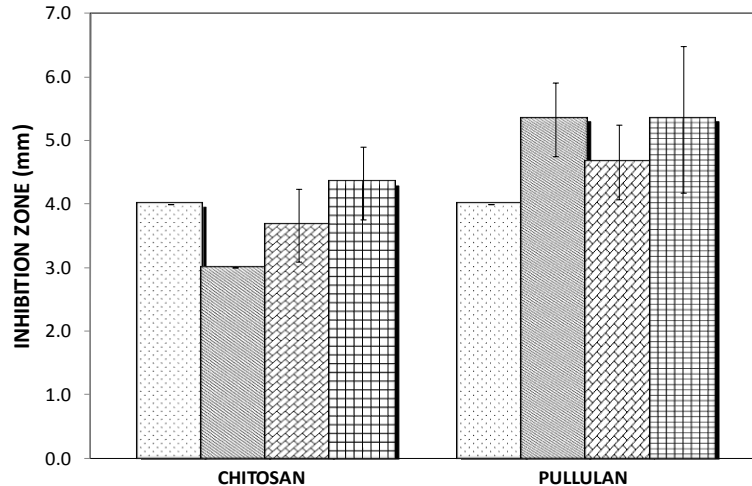


Fig. 2. Antimicrobial activity of the biopolymers with extracts on *P. gingivalis*.

□ Polymer (Control)
 ■ Polymer- *T. vulgaris*
 ▨ Polymer- *J. adstringens*
 ▩ Polymer- *C. lechleri*

In addition, the inhibition zones formed by biopolymers and plant extracts against *P. gingivalis*, are showed in Figure 2.

Chitosan alone showed 4 mm of inhibition zone, 3 mm with *T. vulgaris*, 3.6 mm for *J. adstringens* Schl. and 4.5 mm for *C. lechleri*.

Pullulan with *T. vulgaris* and *C. lechleri* had 6mm for *P. gingivalis*, 5 mm for *J. adstringens* Schl. and 4 mm for Pullulan without extracts.

4. Conclusions

Our results reveal that both biopolymers added with plant extracts have antibacterial activity against the periodontopathogens probed. These *in vitro* data still need to be validated by assessing the clinical performance of the extracts that showed the best activity.

These data encourage further studies with *in vivo* animal experiments to validate these interesting findings.

Acknowledgements This work was supported in part by the National Research Council of Mexico (CONACYT) grant #204231. We want to thankful Dr. Roberto Mercado and MC. Ismael Malagon for statistical assistance. We gratefully acknowledge the technical assistance of Mayra Trevino.

References

- [1] Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.* 1976;84:1-10.
- [2] Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1979;6:351-382.
- [3] Slots J., Mashimo P, Levine MJ, and Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J. Periodontol.* 1979;50:495-509.
- [4] Nisengard and Newman. *Oral Microbiology and Immunology*. Second Edition. W. B. Saunders Company. 1994.
- [5] Cowan, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology.* 1999;Vol 12, No. 4:564-582.
- [6] Li, Q., E. T. Dunn, E. W. Grandmaison, and M. F. A. Goosen. Application and properties of chitosan. in *Application of Chitin and Chitosan*. M. F. A. Goosen, ed. Technomic Publishing, Lancaster, UK. 1997;3-30.

- [7] Shigemasa, Y.; Saito, K.; Sashiwa, H.; Saimoto, H. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.* 1994;16: 43-49.
- [8] Prabaharan, M.; Mano, J.F. Chitosan derivatives bearing cyclodextrin cavities as novel adsorbent matrices. *Carbohydr. Polym.* 2006;63:153-166.
- [9] Wallenfells, K., Bender, H., Keilich, G., and Bechtler, G., Über pullulan, das glucan der schleimhülle von *Pullularia pullulans*. *Angew. Chem.* 1961;73:245-246.
- [10] Yuen, S., Pullulan and its applications. *Process Biochemistry* 1974;9:7-10.
- [11] Tsujisaka, Y., and Mitsuhashi, M., Pullulan. In "Industrial Gums, Polysaccharides and Their Derivatives" Third Ed., eds. Whistler, R. L., and BeMiller, J. N., Academic Press, San Diego, pp. 447-460 (1993).
- [12] Kimoto T, Shibuya T, Shiobara S. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food Chem Toxicol.* 1997;35:323-329.
- [13] Leung S-HS, Leone RS, Kumar LD, Kulkarni N. Fast dissolving orally consumable films. *PCT International Application.* 2000. WO 00/18365.
- [14] Alonso, J. 2007. *Tratado de fitofármacos y neutracéuticos*. 1a. Reimpresión corregida y renovada. Corpus Editorial y Distribuidora; 2007.
- [15] Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2001; 18(6):553-557.
- [16] Tin S, Sakharkar K, Lim C, Sakharkar M. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Sciences.* 2009; 5(2):153-160.
- [17] More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJ. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008;119(3):473-477.

In vitro tests of antifungal activity of plants used in Mexican traditional medicine

I. Peixoto Teixeira Alves¹, A. Oranday-Cárdenas, C. Rivas, J.F. Hofling, M.A. De la Garza-Ramos², L.J. Galán Wong³, K. Arévalo Niño³, A. Rodríguez García*³

¹ DEPARTMENT OF ORAL DIAGNOSIS, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, Sao Paulo, Brazil.

² DEPARTMENT OF CELULAR BIOLOGY, Dental School, Autonomous University of Nuevo Leon, Monterrey, Mexico.

³ INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, Faculty of Biological Science, Autonomous University of Nuevo Leon, Ave. Pedro de Alba s/n. Ciudad Universitaria. San Nicolas de los Garza, N. L. Mexico CP. 66451.

Candidiasis is a common infection of the skin, oral cavity and esophagus, and vagina, although most infections occur in patients debilitated or who are immunocompromised. *Candida albicans* is responsible for many of these infections.

The increase of fungal resistance to classical drugs, the treatment costs, and the fact that most available antifungal drugs have only fungistatic activity, justify the search for new strategies as the use of natural products.

Thymus vulgaris, *Croton lechleri*, *Juliana adstringens* Schl., *Matricaria chamomilla* and *Calendula officinalis* L. are known to have medicinal activity and some of the plants are used in Mexican traditional medicine to treat a wide range of infections. In the present study we investigated the *in vitro* antifungal activity of these five plant extracts against *Candida* spp.

Keywords antifungal activity; *Candida albicans*; *Thymus vulgaris*; *Croton lechleri*; *Juliana adstringens* Schl.; *Matricaria chamomilla*; *Calendula officinalis* L.

1. Introduction

Candida yeasts (especially *C. albicans*) are normal inhabitants of the skin and oral mucosa. The pathogenicity of *Candida* species is relatively low, and some special conditions are required for tissue invasion by the fungus. *C. albicans* is capable of causing host damage (or disease) leading to oral, vaginal, cutaneous, or systemic candidiasis [1].

In recent years fungal infections have been increasing due to a growing number of immunosuppressed and medically compromised patients.

Candida is one of the most-common isolate in nosocomial bloodstream infections of which *Candida albicans* is the principal yeast implicated. *C. albicans* is an opportunistic fungal pathogen capable of life-threatening disseminated infections particularly in immunocompromised patients [2].

Other opportunistic yeast, *Candida dubliniensis*, has been implicated in oral candidiasis and oropharyngeal candidiasis (OPC) in patients infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV).

Several local and systemic host factors, particularly immunocompromising conditions including human immunodeficiency virus (HIV) infection, endocrine disorders, radiotherapy, age, increase in the prevalence of candidiasis [3]. Several groups of antifungal drugs are currently available. However, the choices are limited especially when there is a rise in antifungal resistance due an increase in the use of these drugs for the treatment and prevention of opportunistic fungal infections and in HIV-infected and immunocompromised individuals.

Natural products have been recently investigated more thoroughly as promising agents for the prevention of oral diseases. The increasing resistance to available antimicrobials has attracted the attention of the scientific community regarding a search for new cost-effective drugs of natural or synthetic origin [4].

Essential oils in general demonstrate antimicrobial activity against cariogenic microbes and fungal filaments as well [5].

The increase of fungal resistance to classical drugs, the treatment costs, and the fact that most available antifungal drugs have only fungistatic activity, justify the search for new strategies as the use of natural products.

* Corresponding author: e-mail: aidrod@hotmail.com, Phone: (+52 81) 8315- 1694

Thymus vulgaris (thyme), *Croton lechleri* (sangre de drago), *Juliana adstringens* Schl. (cuachalate), *Matricaria chamomilla* (chamomille) and *Calendula officinalis* L. (marigold) are known to have antimicrobial, antiviral, antiinflammatory and antifungal properties [6, 7, 8, 9].

Owing the antifungal activity probed in previous studies, these plant extracts may have potential in the treatment of candidiasis.

The purpose of this study was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) of the extracts of the five plants against *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

2. Material and Methods

Different parts (flowers, leaves, stems, etc.) of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri*, *Juliana adstringens* Schl., *Matricaria chamomilla* and *Calendula officinalis* L. were extracted with hydroalcoholic solvents. The aqueous extracts obtained were filtered with filters role of Whatman Ltd., sterilized by filtration by 0.22 µm Millipore filters Durapore® GV and stored until their use. Assembly was performed in a Laminar Air Flow cabinet to prevent contamination.

The aqueous extracts were tested *in vitro* for their antifungal activity against two yeasts (*Candida albicans* CBS-562 and *Candida dubliniensis* CBS-7987). Fluconazole (Pfizer) was used as positive control.

Minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained by microdilution method on a sterile 96 well culture plate. RPMI- 1640 medium (Sigma) containing varying amounts (serial twofold diluted) of each extract was inoculated with actively yeasts. 100 µL aliquots of plant extracts were dispensed into each well for a concentration ranging from 1.6 to 50 mg/ml. Then, 100 µL of yeast inoculums containing 1×10^3 yeast cells/mL was added to each well. A growth control, RPMI medium was included for each strain. After 24 hours incubation, the growth was monitored at 600nm. The MIC was defined as the lowest concentration required to arrests the growth of the fungi at the end of 24 hours incubation. For determination of minimum fungicidal concentration (MFC), a 0.01 –mL aliquot of the medium drown for the culture plaques showing no macroscopic growth at the end of 24 hours culture was sub-cultured on Sabouraud dextrose agar (Difco) plates to determine the number of vital microorganisms after incubation for 24 hours at 37°C. The MFC was defined as the lowest concentration of the agent that reduced the number of viable organisms by 99.9%.

These experiments performed in duplicate were repeated independently three times.

All statistical results were performed by SPSS version 17.0. The antifungal activity of the extracts on *Candidas* was analyzed by analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was defined as $P < 0.5$.

3. Results and Discussion

There has been an increase in the prevalence of fungal infections. At the same time, drug resistance has become an important issue in a variety of fungal infections, which have profound effects on human health. The rise in prevalence of fungal infections and drug resistance has exacerbated the need of new antifungal agents [4].

Previous studies showed that extract from *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri*, *Juliana adstringens* Schl., *Matricaria chamomilla* and *Calendula officinalis* L. has demonstrated antifungal activity against pathogenic fungus [6, 7, 8, 9].

The present study demonstrated the different results of the antifungal activity of the five extracts against *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

There are some possible explanations for the differences in biological activities of each extract. Firstly, it is known that similar plants growing in different geographical locations may be phytochemically different. Secondly, the active constituents of plants vary greatly depending of the extraction technique and the solvents used [10].

MIC obtained for *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri*, *Juliana adstringens* Schl., *Matricaria chamomilla* and *Calendula officinalis* L. on cultures of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* and determined by broth dilution technique are summarized in Figure 1.

summarized in Figure 1.

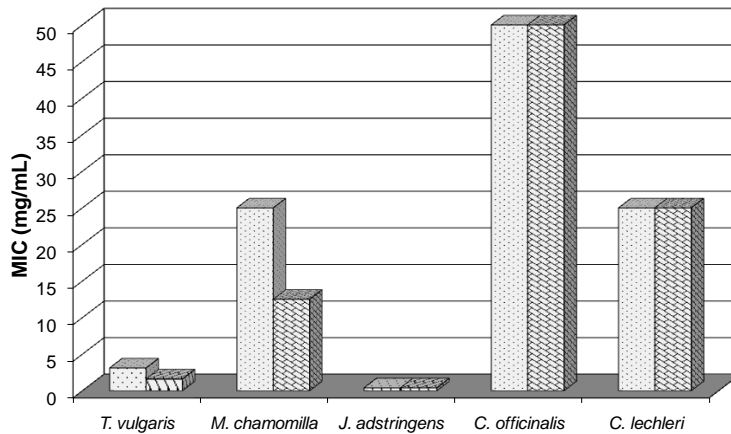


Fig. 1. Minimum inhibitory concentration of the five extracts on planktonic cultures of *Candida*.

□ *Candida albicans*
 ▨ *Candida dubliniensis*

Our results indicate that MIC for *T. vulgaris* is 3.12 mg/mL for *C. albicans* and 1.6 mg/mL for *C. dubliniensis*. 25 mg/mL of *M. chamomilla* for *C. albicans* and 12.5 mg/mL for *C. dubliniensis*. For *J. adstringens* 0.4 mg/mL was the concentration for both strains. *C. officinalis* needs higher concentrations (50mg/mL) for the two strains probed while the minimum inhibitory concentration for *C. lechleri* was mg/mL.

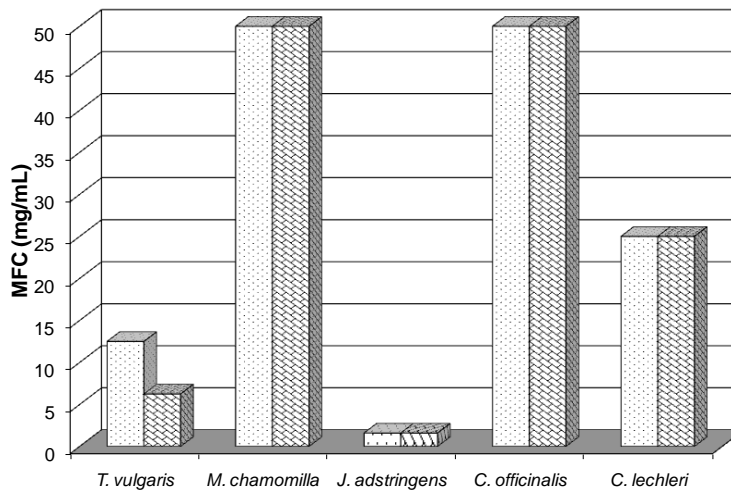


Fig 2. Minimum fungicidal concentration of the plant extracts on planktonic cultures of *Candida*.

□ *Candida albicans*
 ▨ *Candida dubliniensis*

Figure 2 show the MFC of the five extracts on both strains. The determination of minimum bactericidal concentration of *T. vulgaris* was 12.5 mg/mL for *C. albicans* and 6.25 mg/mL for *C. dubliniensis*. 50 mg/mL was the concentration for *M. chamomilla*. For *J. adstringens* the minimum bactericidal concentration was 1.6 mg/mL for both strains , 50 mg/ml for *C. officinalis* and 25 mg/mL for *C. lechleri* in both strains tested.

3. Conclusions

The strong antifungal activity of *J. adstringens* Schl. may make it good candidate for further development as antifungal agent for candidiasis therapy. However, the clinical significance of these *in vitro* results should be verified by clinical trials.

Acknowledgements We are grateful with Vilma Suarez for technical support and MC. Ismael Malagon for assistance with statistical analysis.

References

- [1] Grubb S, Murdoch C, Sudbery P, Saville S, Lopez-Ribot JL, Thornhill M. *Candida albicans*-Endothelial Cell Interactions: a Key Step in the Pathogenesis of Systemic Candidiasis. *Infection and Immunity*. 2008;76(10):4370–4377.
- [2] Wilson, L. S., C. M. Reyes, M. Stolpman, J. Speckman, K. Allen, and J. Beney. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health*. 2002;5:26–34.
- [3] Samaranayake LP, Cheung LK, Samsranayake YH. Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. *Dermatol Ther*. 2002;15: 251-269.
- [4] Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, et al. Effect of an essential oil containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *J Clin Periodontol* 2000; 27:157-161.
- [5] Prashar A, Hili P, Veness RG, Evans CS. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 2003;63:569-575.
- [6] Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can. J. Microbiol*. 2008; 54(11):950-956.
- [7] Nogueira JC, Diniz Mde F, Lima EO. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(1):118-124.
- [8] Ruiz-Bustos E, Velazquez C, Garibay-Escobar A, García Z, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, Hernandez-Martínez J, Robles-Zepeda RE. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *J Med Food*. 2009;12(6):1398-402.
- [9] Alonso, J. *Tratado de fitofármacos y neutracéuticos*. 1a. Reimpresión corregida y renovada. Corpus Editorial y Distribuidora. 2007.
- [10] Richter J, Schellenberg I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387(6):2207-2217.

In vitro tests of biopolymers with extracts from plants used in Mexican traditional medicine on *Candida albicans* biofilm

J. de Cássia Orlandi Sardi¹, I. Teixeira Alves Peixoto¹, J.F. Höfling¹; R. Bruno Gonçalves¹, A. Rodríguez García²; L. J. Galán Wong²; K. Arévalo Niño², J. L. López Ribot³; C. Pierce³

¹ UNICAMP. Microbiology, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, , Sao Paulo, Brazil.

² INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, Faculty of Biological Science, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico. Ave. Pedro de Alba s/n. Ciudad Universitaria. San Nicolas de los Garza, N. L. Mexico CP. 66451.

³ DEPARTMENT OF BIOLOGY and South Texas Center for Emerging Infectious Diseases, The University of Texas at San Antonio, Texas, USA.

Biofilm formation plays a key role in the life cycles and subsistence of many microorganisms. The human fungal pathogen *Candida albicans* has a high propensity to develop biofilms and resulted resistant to traditional antifungal agents. The increase of fungal resistance to classical drugs, the treatment costs, and the fact that most available antifungal drugs have only fungistatic activity, justify the need for new strategies that make use of natural products and biotechnology. The aim is to find new effective antifungal agents from *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. against *Candida albicans* using these extracts in chitosan and pullulan biopolymers.

Keywords Biofilm formation; *Candida albicans*; antifungal agents; *Thymus vulgaris*; *Croton lechleri*; *Juliana adstringens* Schl.; Chitosan; Pullulan

1. Introduction

Candida albicans is a major human pathogen, causing both mucosal and deep tissue infections. During recent years the *Candida* species, have become one of the most common agents of hospital-acquired infections [1].

Candidiasis is an increasing health threat to immune compromised individuals and infections are commonly associated with the formation of biofilms, which are defined as complex microbial communities attached to a surface and encased in an exopolymeric matrix. Biofilms are composed of a mixture of cell types, including yeast, pseudohyphal and hyphal cells, and hyphae are a prominent feature of biofilms [2].

Within this niche, *C. albicans* has intrinsic resistance to commonly used antifungal drugs. The increase of resistance associated with biofilms remarks the importance of determine the effectiveness of natural antifungal agents against fungal biofilms.

The ability to produce biofilm by those yeasts plays an important role in the pathogenesis of candidiasis. *Candida* biofilm can form on the surface of plastic materials (silicon, polychloride vinyl, polymethacrylate methyl) used to catheters, drains and dentures production that is why it is a serious problem in case of fungal infections in patients who during the diagnosis and treatment have contact with biomaterials [3, 4].

Most of the models for the formation of microbial biofilms are complex and requiring expert handling, longer processing time and specialized equipment not generally available in a regular laboratory.

Aqueous extracts from various plants are used in Mexican traditional medicine on some microorganisms associated with human infections. Thyme, chamomile, marigold, cuachalalate and sangre de drago have been used for their antimicrobial properties.

Chitosan is a polysaccharide derived by deacetylation of chitin, which is a copolymer of N-acetyl-glucosamine and N-glucosamine units randomly distributed throughout the polymeric chain. There are numerous works on the use of chitosan in a number of biomedical applications, including drug-delivery systems, tissue engineering, orthopedics [5].

Pullulan is a neutral linear polysaccharide composed of (1→6)-linked α -D-maltotriose residues and is synthesized from starch or sugar by *Aureobasidium pullulan* [6] which has adhesive properties and can be used in wound-healing compositions [7].

* Corresponding author: e-mail: aidrod@hotmail.com, Phone: (+52 81) 8315- 1694

2. Material and Methods

3.1 Plant extracts

Different parts of the plants of *Thymus vulgaris* (thyme), *Croton lechler* (Sangre de Drago) and *Juliana adstringens* Schl. (cuachalalate) were collected and extracted with hydroalcoholic solvents to obtain aqueous and extracts. The extracts were filtered and sterilized by filtration by 0.22 µm Millipore filters Durapore® GV and stored in sterile amber bottles.

3.2 Preparation of the polymers

Three formulations of each polymer were tested to obtain the best properties for the production of films. 1.0, 1.2 and 0.8 g of chitosan powder were dissolved in 100 mL 1% (vol/vol) acetic acid aqueous solution for a final concentration of 1%, 1.2% and 0.8%.

Pullulan was used at 10%, 12%, 10% (plus sorbitol) and dissolved in bidistilled water.

The best formulation for each polymer (1% chitosan, 10% pullulan) were selected and added to predetermined amounts of plant extracts: 10% of *T. vulgaris*, 11% *J. adstringens* Schl and 20% *C. lechleri*.

The method used was "casting" pouring the formulation into acrylic moulds (board), spreading the mixture with a spoon and drying at room temperature. Films were recovered manually after 24 hours. Once recovered, the films were cut with a 6 mm diameter drill and stored at 25°C and 25% relative humidity.

3.3 Biofilm formation

Candida albicans SC5314 were prepared on Sabouraud dextrose agar plates and stored at 4°C until its use. A method described previously was followed [8]. Cells were inoculated in flasks containing yeast peptone dextrose (YPD) liquid medium and incubated overnight in an orbital shaker (150- 180 rpm.) at 30°C. The overnight- grown liquid cultures were centrifuged at 3,000 g for 5 min at 4°C. Supernatant was removed and washed twice with sterile PBS. Pellet was resuspended in approximately 20 mL of RPMI 1640 prewarmed at 37°C. 100 µL of inoculum with a suspension of 1x 10⁶ cells mL⁻¹ of cells density were performing in each well of 96-well microtiter plate. The plates were incubated for 24 hours at 37°C. After biofilm formation, the medium was aspirated carefully. The plates were washed three times in sterile PBS to remove planktonic and free cells.

3.4 Inhibition tests

One test consisted in add each biopolymer prepared with the extracts on the wells of microtiter plate before incubation. Other probe was adding the biopolymer to probe the inhibition on biofilm preformed 24 h before.

These models were coupled with a colorimetric XTT-reduction assay in which metabolically active sessile cells reduce a tetrazolium salt to water-soluble orange formazan compounds. 100 µl of the XTT/menadione solution were added to each well containing a prewashed biofilm as well as to negative control wells. The plates were covered with aluminum foil and incubated in the dark for 2-3 hours at 37°C. Visual inspection was made to demonstrate a gradient of orange color. The intensity of the product was reading and determined using a microtiter-plate reader at 490 nm. All assays and controls were made three times in triplicate.

3. Results and Discussion

Candida albicans is an important bacterial pathogen most frequently responsible for nosocomial infections [1]. It is often resistant to many antibiotics used in causative therapy. The efficacy of many antibiotics for treatment of severe infections has become quite limited due to the development of resistance. Improving the effectiveness and decreasing the toxicity of antibiotics are the two basic objectives in the development of novel antimicrobial agents.

Many works published indicate that some plant extracts and the biopolymers as chitosan has certain in vitro antibacterial activity [9,10].

Chitosan biopolymers showed inhibitory activity with *T. vulgaris* and *C. lechleri*, with 51.5% and 44% biofilm inhibition, respectively. However, there was low activity using Chitosan added with *J. adstringens*. The biopolymers did not have significant inhibitory effects on preformed *C. albicans* biofilms (Fig. 1).

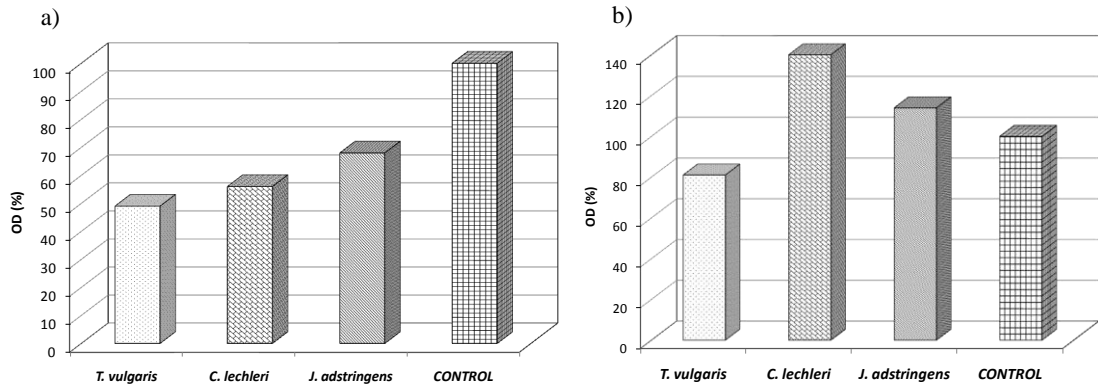


Fig. 1. *Inhibitory activity of Chitosan on Candida biofilm formation.* a) Biofilm formed in presence of Chitosan. b) Biofilm preformed 24h before add the biopolymer. Amphotericine B (control).

Our results revealed that Pullulan biopolymers with *J. adstringens* Schl. inhibited biofilm formation about 100%, while *T. vulgaris* showed low activity (2.5% biofilm inhibition), and *C. lechleri* inhibited biofilm formation about 52.5% (Figure 2).

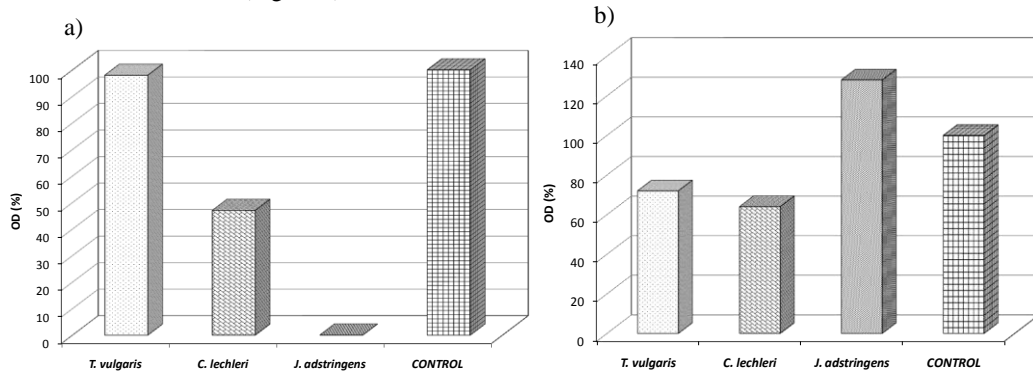


Fig. 2. *Inhibitory activity of Pullulan on Candida biofilm formation.* a) Biofilm formed in presence of Pullulan. b) Biofilm preformed 24h before add the biopolymer. Amphotericine B (control).

4. Conclusions

Our results showed that pullulan with *J. adstringens* exhibited strong antifungal activities in formation of *C. albicans* biofilm in presence of this polymer, while *T. vulgaris* and *C. lechleri* exhibited inhibitory effects in biofilm formed in presence of chitosan biopolymers. None of the biopolymers had inhibitory effects on preformed biofilm. These findings could also prove to be a promising alternative in the treatment of patients for whom existing antimicrobial treatment fails.

Acknowledgements We are thankful by grant 204231 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT). Mexico. We extend our thanks to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

References

- [1] Al-Fattani M. A., Douglas L. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004;48: 3291-3297.

- [2] Richard M. L., Nobile C. J., Bruno V. M., Mitchell A. P., *Eukaryot. Cell.* 2005; 4; 1493-1502.
- [3] Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006;6: 979-986.
- [4] Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005;4: 633-638.
- [5] Hu Q, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials.* 2004; 25:5: 779-785.
- [6] Wallenfells, K., Bender, H., Keilich, G., and Bechtler, G., Über pullulan, das glucan der schleimhülle von *Pullularia pullulans*. *Angew. Chem.*1961;73:245-246.
- [7] Leung S-HS, Leone RS, Kumar LD, Kulkarni N. Fast dissolving orally consumable films. PCT International Application. 2000. WO 00/18365.
- [8] Pierce C., Uppuluri P., Tristan A., Wormley F., Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols.* 2008; Vol. 3:9: 1494-1500.
- [9] Park Y, Kim MH, Park SC, Cheong H, Jang MK, Nah JW, Hahm KS. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(10):1729-1734.
- [10] Tapia CP, Soto DM, Vergara LG, Albuquerque CO, Maccioni AR, Matamata AM, Hermosilla GD, Bucarey SV. Antifungal effect of high molecular weight chitosan on *Candida* spp isolated from clinical samples. *Rev Chilena Infectol.* 2009;26(6):515-519.



**Elaboration and Evaluation of Membranes from Biopolymers
as Delivery System of Plant Extracts**

Journal:	<i>Journal of Materials Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Biomaterials Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	RODRIGUEZ GARCIA, AIDA; Institute of Biotechnology FCB/UANL, Laboratory 1 GALAN-WONG, LUIS J.; Institute of Biotechnology FCB/UANL, Laboratory 1 Arevalo-Niño, Katiushka; Institute of Biotechnology FCB/UANL, Laboratory L1
Key Words:	film, polymer, storage

Elaboration and Evaluation of Membranes from Biopolymers as Delivery System of Plant Extracts

Aída Rodríguez García, Luis J. Galán Wong, Katiushka Arévalo Niño
Institute of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo Leon. Pedro de Alba y Av. Manuel L. Barragan S/N. Cd. Universitaria. San Nicolas de los Garza, N.L. CP. 66450. Mexico.

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are considered key pathogens in periodontitis that is the principal cause of tooth loss in adults. The treatment of periodontal disease consists on the use of chemicals can alter oral microbiota and have undesirable side-effects such as vomiting, diarrhea and tooth staining.

At recent years, the use of natural sources like biomaterials such as biopolymers and plant extracts are enjoying great popularity. Chitosan and pullulan are polymers that have been proposed due to their favorable properties such as biocompatibility, biodegradability, adhesion ability and nontoxicity.

The aim of this study was to develop films from chitosan and pullulan containing plant extracts as delivery system and determine the in vitro antibacterial activity against periodontopathogen microorganisms and their stability under different conditions of storage.

Key words film, polymers, storage

INTRODUCTION

Dental diseases are chronic infections caused by oral bacteria harboring the dental biofilm. Periodontitis is an infectious and inflammatory process that is associated with anaerobic Gram-negative bacteria [1] and affects teeth-supporting structures and is the major cause of tooth loss in adults. *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are considered the principal microorganisms involved in the process.

The aim of current periodontal therapy is to remove the bacterial deposits from the tooth surface and to shift the pathogenic microbiota to one compatible with periodontal health [2]. Therapeutic approaches include surgical techniques and mechanical debridement of the root surfaces and/or treatment of the infection with systemic or local antibiotics [3]. Local delivery of antimicrobial agents is becoming more prevalent since it leads to higher concentration of the drug at the intended site of action using a lower dose with an associated reduction in side effects relative to systemic administration.

In the last decade, polymer based technologies have found wide biomedical applications. Natural polymers as chitosan and pullulan have the property of encapsulating a diverse range of molecules of biological interest and bear distinct therapeutic advantages such as controlled release of drugs, protection against the premature degradation of drugs and reduction of drug toxicity. These are important considerations in the long-duration treatment of infectious diseases. Due to these properties, they are widely used for biomedical applications such as tissue

1
2
3 engineering scaffolds, drug delivery, wound dressings, separation membranes and antibacterial
4 coatings. Delivery systems based in these polymers can be pleased in the specific site. As a
5 result, they maintain the drug locally without undesirable side effects.

7 Chitosan [(1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan] is a cationic linear aminopolysaccharide
8 obtained by partial N-deacetylation of chitin, the latter being one of the most abundantly
9 occurring natural biopolymer which is present as a structural component of the exoskeletons of
10 crustaceans, insects and other arthropods, as well as in the cells walls of certain fungi. Chitosan
11 displays certain properties by virtue of the presence of free amino groups which make it a
12 versatile polymer with a broad range of applications in several fields including biomedicine,
13 pharmacy, agriculture and the food and paper industries [4].

15 Pullulan is a neutral linear polysaccharide composed of (1→6)-linked α-D-maltotriose
16 residues and is synthesized from starch or sugar by *Aureobasidium pullulan* [5]. Its unique
17 linkage pattern is believed to be responsible for the structural flexibility and solubility of
18 pullulan, resulting in distinct film- and fiber-forming characteristics not exhibited by other
19 polysaccharides. It is highly water-soluble and form edible film which is colorless and tasteless.
20 Pullulan and its derivatives exhibit adhesive properties and can be used in wound-healing
21 compositions [6,7,8].

23 *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl., are known to have
24 antimicrobial activity [9], and they are used in Mexican traditional medicine. Their extracts were
25 tested in vitro, in a previous work, for their antimicrobial activity against *P. gingivalis* and *A.*
26 *actinomycetemcomitans* [10].

28 The aim of this work was to develop membranes of chitosan and pullulan as delivery
29 system of aqueous plant extracts and evaluate their antimicrobial activity against *P. gingivalis*
30 and *A. actinomycetemcomitans*, and their stability under different conditions of storage.
31
32
33

34 EXPERIMENT

36 Bacterial strains and culture conditions

37
38 Two strains were used in this study: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 and
39 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 were activated in trypticase soy broth and
40 brain heart infusion in the anaerobic chamber and incubated at 35°C for 48 hours in anaerobic
41 and 5% CO₂ atmosphere conditions respectively.
42
43
44

45 Antimicrobial activity of plant extracts

46
47 Values of the MIC and MCB of the extracts were determined by broth microdilution and agar
48 diffusion methods in a previous work [10].
49
50

51 Elaboration of the membranes

52 Two different biopolymers were used in the present study. Chitosan with deacetylation degree
53 85% was purchased from Sigma Chemical CO. St. Louis MO. USA. Pullulan (molecular
54 weight=200,000) was donated by Hayashibara Company (Okayama, Japan).
55 Three different formulations of each biopolymer were tested to obtain the best properties for the
56 production of membranes. 1.0, 1.2 and 0.8 g of chitosan powder were dissolved in 100 mL 1%
57
58
59
60

(vol/vol) acetic acid aqueous solution by stirring at room temperature for a final concentration of 1%, 1.2% and 0.8%.

Pullulan was used at 10%, 12% and 10%, plus sorbitol (as plasticizer) and bidistilled water. The best formulation for each biopolymer (1% for chitosan and 10% for pullulan) were selected and added to predetermined amounts of plant extracts: 80 mg/mL of *T. vulgaris*, 60 mg/mL *J. adstringens* Schl and 90 mg/mL *C. lechleri* and stirred until the mixture became homogeneous. pH of each suspension was measured with a potentiometer. The average of pH was 3.9 for chitosan and 5.7 for pullulan.

The method used was "casting", pouring the formulation into acrylic moulds measuring 20 cm × 20 cm, spreading the mixture manually with a spoon and drying at room temperature.

Membranes were recovered manually after 24 hours. Once recovered, the membranes were cut with a 6 mm diameter hole puncher and kept at different conditions of storage: 25°C and 4°C; 65% and 25% relative humidity, and light or darkness until they were used.

The thicknesses of the membranes of both polymers with and without extracts were measured with a micrometer (Mitutoyo, Japan) and the mean value was calculated.

The discs made from membranes of biopolymers were classified as:

CH (Chitosan), CH-*Tv* (Chitosan- *T. vulgaris*), CH-*Ja* (Chitosan- *J. adstringens*), CH-*Cl* (Chitosan- *C. lechleri*), P (Pullulan), P-*Tv* (Pullulan-*T. vulgaris*), P-*Ja* (Pullulan-*J. adstringens*), P-*Cl* (Pullulan-*C. lechleri*).

Antimicrobial activity of the discs of biopolymers by disc diffusion assay

The discs (6 mm in diameter) of biopolymers with the added extracts were applied by pressing slightly on the solid trypticase and brain heart infusion agar medium inoculated with 1 µL of bacterial suspension (10⁸ CFU/mL) of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h in anaerobiosis and 5% CO₂ atmosphere conditions. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zones formed on the media in millimeters with a ruler. All inhibition assays and controls were repeated three times with each test conducted in duplicate. The collected data were analyzed by descriptive statistics ANOVA test using SPSS 17.0 software. The results were presented as mean ±S.D. Statistical significance was accepted at the p<0.05 level.

Solubility tests

The solubility tests were performed immersing the discs of polymers in watch glasses containing 3 mL of artificial saliva until the discs were dissolved totally.

RESULTS

The increased drug resistance, the secondary effects of some antibiotics and mouthwashes like chlorhexidine, used in the treatment of periodontitis [2], the new biotechnology tools and the antimicrobial activity of some plants, justify the development of novel options as alternative of dental treatment.

Previous works indicate that chitosan and pullulan have certain in vitro antibacterial activity [5,11]. In this work we probed the antimicrobial activity of two biopolymers (chitosan and

pullulan) added to aqueous extracts of *T. vulgaris*, *J. adstringens* Schl. and *C. lechleri* on cultures of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* using the disc diffusion method. The inhibitory effect of biopolymers added with the three plant extracts on cultures of *A. actinomycetemcomitans* is showed in Figure 1 and 2.

There was a high significant difference in the antimicrobial activity of the biopolymers, time of storage and temperature (Figure 1 and 2), however any significant difference was presented under relative humidity and light conditions (data not showed).

The highest antimicrobial activity against *A. actinomycetemcomitans* was with the pullulan films. Pullulan with *J. adstringens* had the best antimicrobial activity against this microorganism (Figures 1 and 2). Decreased antimicrobial activity of both polymers stored at 25°C was observed with increasing time of storage.

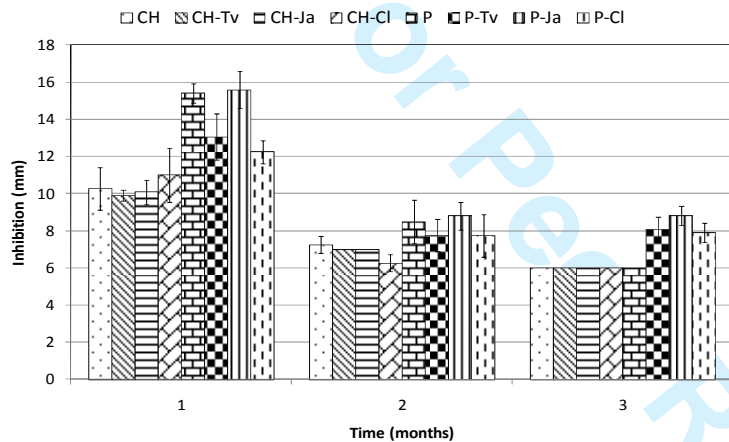


Fig. 1. Effect of the temperature of storage (25°C) in the antimicrobial activity of the biopolymers added with plant extracts on cultures of *A. actinomycetemcomitans* over the three months test period.

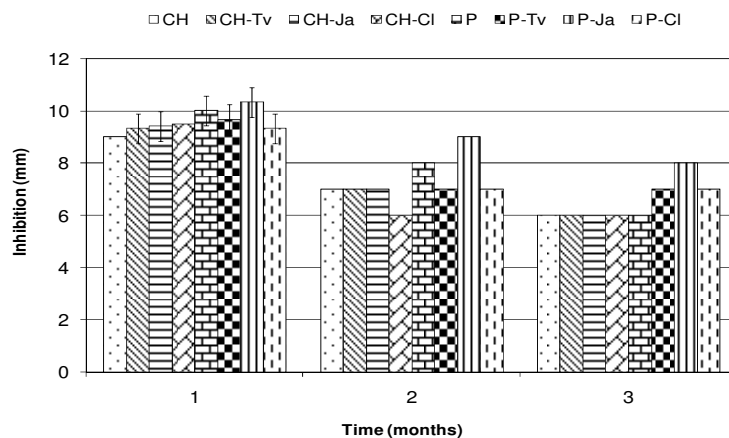


Fig. 2. Effect of the temperature of storage (4°C) in the antimicrobial activity of the biopolymers added with plant extracts on cultures of *A. actinomycetemcomitans* over the three months test period.

Figures 3 and 4 show the antimicrobial activity of the biopolymers on cultures of *P. gingivalis*. There was not significant difference in the inhibitory effect by the interaction of polymers, time of storage, temperature and light conditions (data not showed).

Although an important decrease in the antimicrobial activity of both biopolymers with the time of storage was observed, chitosan was the most stable at different conditions of storage during the whole experimental period. There was not significant difference ($p \geq .05$) in the inhibition of *P. gingivalis* with both biopolymers. The discs made of chitosan added with *C. lechleri* and *J. adstringens* and all the pullulan discs stored as 4°C showed the best antimicrobial activity at lower concentrations on *P. gingivalis* at the first month.

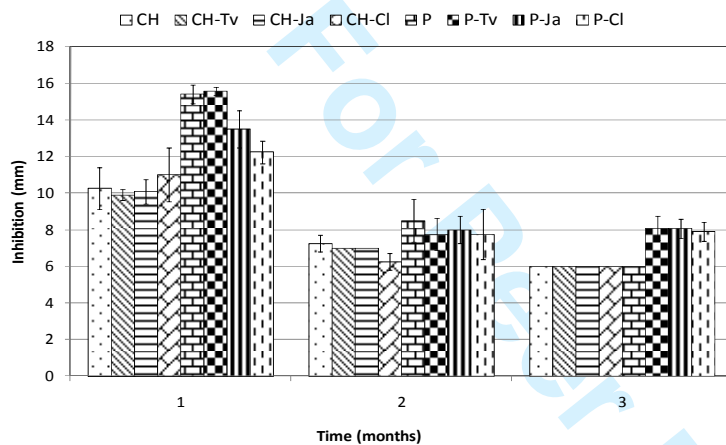


Fig. 3. Effect of the temperature of storage (25°C) in the antimicrobial activity of the biopolymers added with plant extracts on cultures of *P. gingivalis* over the three months test period.

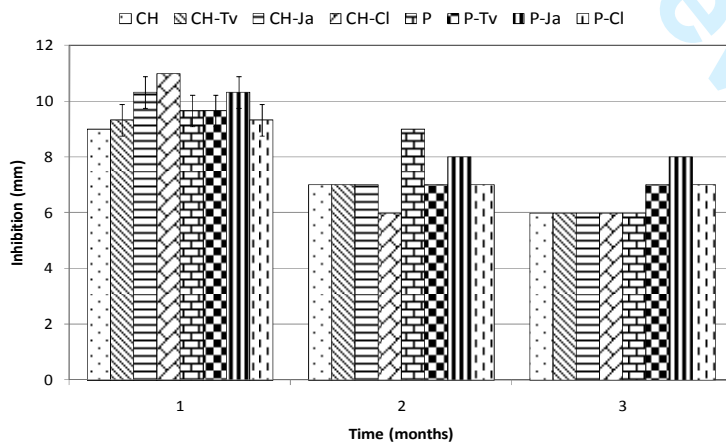


Fig. 4. Effect of the temperature of storage (4°C) in the antimicrobial activity of the biopolymers added with plant extracts on cultures of *P. gingivalis* over the three months test period.

Figures 5 and 6 show the average of solubility time of the biopolymers on artificial saliva. All the discs of pullulan stored at both relative humidity and light conditions showed the less time of solubility. Chitosan films without extracts and chitosan with *J. adstringens* Schl. were not dissolved in the first 24 hours.

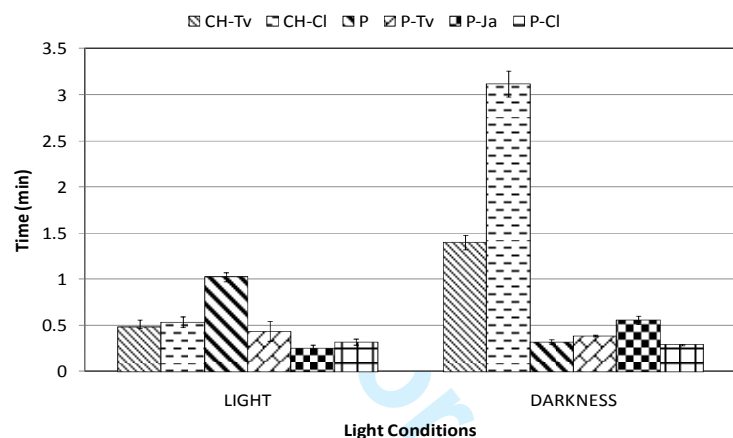


Fig. 5. Solubility time of the membranes stored at relative humidity of 60% with and without light.

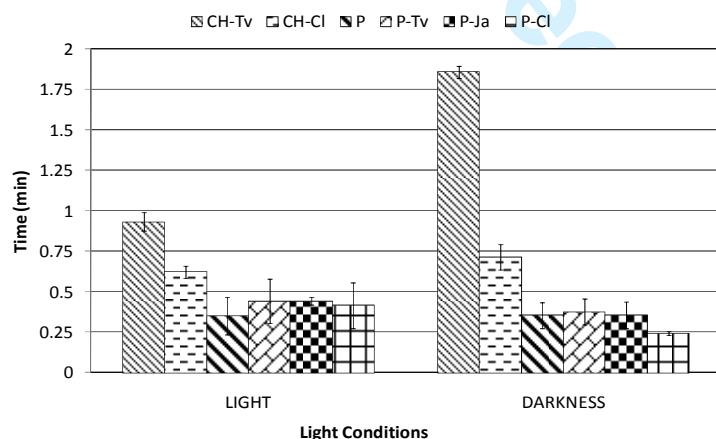


Fig. 6. Solubility time of the membranes stored at relative humidity of 25% with and without light.

CONCLUSIONS

It was concluded that both biopolymers added with aqueous extracts of *Thymus vulgaris*, *Croton lechleri* and *Juliana adstringens* Schl. and stored under different conditions of relative humidity, temperature and light have antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

For oral diseases as periodontitis, the delivery of a drugs in the right place can minimize systemic adverse reactions, reduce drug dosage and eventually lower the cost and improve patient compliance.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the National Research Council of Mexico (CONACYT) grant #204231. We would like to thank to Hayashibara Co. for the generous donation of Pullulan. We also thank Dr. Guadalupe Rojas Verde for statistical assistance.

REFERENCES

1. Slots, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.* 84:1-10 (1976).
2. Slots, J., P. Mashimo, M. J. Levine, and R. J. Genco. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J. Periodontol.* 50:495-509. (1979).
3. Nisengard and Newman. *Oral Microbiology and Immunology*. Second Edition. (W. B. Saunders Company, 1994).
4. Kurita, K. Chemistry and Application of Chitin and Chitosan. *Polym. Degrad. Stabil.* 59: 117–120 (1998).
5. Leung S-HS, Leone RS, Kumar LD, Kulkarni N. Fast dissolving orally consumable films. PCT International Application. WO 00/18365. (2000).
6. Yuen, S., Pullulan and its applications. *Process Biochemistry*, 9, 7-10 (1974).
7. Tsujisaka, Y., and Mitsuhashi, M. *Pullulan*. In “*Industrial Gums, Polysaccharides and Their Derivatives*” Third Ed., eds. Whistler, R. L., and BeMiller, J. N. (Academic Press, San Diego, 1993) pp. 447-460.
8. Kimoto T, Shibuya T, Shiobara S. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food Chem Toxicol.* 35:323–329. (1997).
9. Alonso, J. *Tratado de fitofármacos y neutraceuticos*. 1a. Reimpresión corregida y renovada. (Corpus Editorial y Distribuidora, 2007).
10. Rodríguez García A, Galán Wong LJ, Rojas Verde G, Arévalo Niño K. 2010. Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L., *Juliana adstringens* Schl. against periodontopathogen microorganisms. *Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products.* (World Scientific Pub. Co. 2010) (in press) pp. 463-467.
11. Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polym.* 54:527-530 (2003).

DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF BIOPOLYMERS AS A DELIVERY SYSTEM AGAINST PERIODONTOPATHOGEN MICROORGANISMS

Aida Rodriguez-Garcia, Luis J. Galan-Wong, Katiushka Arevalo-Niño

Institute of Biotechnology, Faculty of Biological Science,
Autonomous University of Nuevo Leon.

ABSTRACT

Periodontal disease is the major cause of tooth loss in adults. *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are considered key pathogens in periodontitis. The treatment consists of oral hygiene education, instrumentation for removal of calculus (scaling), chemotherapy and periodontal surgery. Several agents are commercially available; these chemicals can alter oral microbiota and have undesirable side-effects such as vomiting, diarrhea and tooth staining. Hence, the search for alternative products continues and natural phytochemicals isolated from plants used as traditional medicine and the use of biomaterials are considered good alternatives. Chitosan and pullulan are polymers that have been proposed due to their favorable properties such as biocompatibility, biodegradability, and adhesion ability. They can be used as local delivery systems of active principles of plant extracts.

Thymus vulgaris, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L. and *Juliana adstringens* Schl. are known to have medicinal activity, and they are used in Mexican traditional medicine. Their extracts were tested in vitro for antimicrobial activity against *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, using agar diffusion and microdilution methods. The antimicrobial activity of films from biopolymers with plant extracts was evaluated by measuring the zones of inhibition against the tested organisms.

The aim of this study was to develop bioadhesive films from chitosan and pullulan with added plant extracts and determine the antimicrobial activity of films against periodontal pathogens.

Key words: biopolymers, plant extracts, delivery system, antimicrobial activity, periodontopathogen microorganisms.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN IN VITRO DE BIOPOLÍMEROS COMO UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTRA MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS

RESUMEN

La enfermedad periodontal es la principal causa de pérdida de dientes en los adultos. Los agentes causales comunmente identificados con la enfermedad son *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. El tratamiento de la enfermedad consiste en educación sobre higiene oral, remoción de cálculos por medio de instrumentación (raspado y alisado de la raíz), la administración de medicamentos y cirugía. Hay múltiples agentes químicos disponibles comercialmente; éstos pueden alterar la microflora oral y tener efectos secundarios indeseables como vómito, diarrea y pigmentación dental. Por lo tanto, los productos naturales como los fitoquímicos aislados de plantas que son usadas como medicinas tradicionales y los biomateriales, son considerados buenas alternativas. El quitosán y el pululan son polímeros que han sido propuestos debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, habilidad de adhesión y que pueden ser usados como sistemas de liberación de los principios activos de extractos de plantas.

Los extractos de *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L. y *Juliana adstringens* Schl. son conocidos por tener actividad medicinal y se usan en la medicina tradicional Mexicana. La actividad antimicrobiana de sus extractos fue probada in vitro contra *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* usando los métodos de difusión en agar y de microdilución. La actividad antimicrobiana de películas a base de biopolímeros con extractos de plantas fue evaluada midiendo las zonas de inhibición de crecimiento de los organismos probados.

El propósito de este estudio fue desarrollar películas bioadhesivas de quitosán y pululan adicionadas con extractos de plantas y evaluar su actividad antimicrobiana contra periodontopatógenos.

Palabras clave: biopolímeros, extractos de plantas, sistema de liberación, actividad antimicrobiana, microorganismos periodontopatógenos.

INTRODUCTION

Periodontal disease is an undesirable condition which has widespread occurrence. It is an inflammatory disease that affects the periodontum, which consists of the investing and supporting tissues sur-

rounding a tooth (i.e., the periodontal ligament, the gingiva, and the alveolar bone¹).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Tannerella forsythensis* and *Porphyromonas gingivalis*, are among the principal microorganisms associated with

the process of periodontal diseases^{2,3}. Microorganisms contribute to both the initiation and progression of gingivitis, plaque, and periodontal disease. Therapeutic approaches include oral hygiene instruction, surgical techniques and mechanical debridement of the root surfaces, scaling and/or treatment of the infection with systemic or local antibiotics⁴.

As a public health concern, the notion of periodontal disease being a risk factor for cardiovascular disease, stroke and premature birth brings increased urgency to the need for controlling and preventing the disease in a cost-efficient manner⁵.

Chitosan a (1→4)-linked 2-amino-2-deoxy-s-D-glucan, is prepared by N-deacetylation of chitin, which is the second most abundant polysaccharide found in nature⁶ and distributed widely in nature, especially in marine invertebrates, insects, yeast, and fungi. There are numerous works on the use of chitosan in a number of biomedical applications, including drug-delivery systems, tissue engineering, and orthopedics⁷.

Pullulan is a neutral linear polyssacharide composed of (1→6)-linked α -D-maltotriose residues synthesized from starch or sugar by *Aureobasidium pullulan*, which has adhesive properties and can be used in wound-healing compositions⁸.

Medicinal plants have been used as traditional treatments for numerous human diseases for thousands of years in many parts of the world. Mexico has a great wealth of medicinal plants and it has been popular tradition to use plants for scientific investigation, many of which deal with the antimicrobial properties of the plant extracts and their potential as a clinically relevant antimicrobial therapy.

Thymus vulgaris (thyme), *Matricaria chamomilla* (chamomile), *Croton lechleri* (sangre de drago), *Calendula officinalis* L. (marigold) and *Juliana adstringens* Schl. (cuachalalate) are known to have antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory and anti-fungal properties⁹⁻¹¹.

Many compounds derived from plants used in traditional medicinal systems have been recorded in pharmacopeias as agents used to treat infections, and a number of these have been recently investigated for their efficacy against oral microbial pathogens.

Essential oil and extracts from fresh leaves and flowers of *T. vulgaris* can be used as aromatic additives in foods, pharmaceuticals, and cosmetics. Its primary constituents are thymol and carvacrol.

The constituents of *M. chamomilla* thought to have antimicrobial properties include alpha-bisabolol, luteolin, quercetin, and apigenin¹¹.

The chemical composition of *C. lechleri* includes a considerable number of compounds, including several simple phenols and diterpenes, proanthocyanidins, and phytosterols¹².

Marigold is a phytotherapeutic plant rich in biologically active metabolites, such as sesquiterpens, triterpens, flavonoids, carotenoids and tannins. These components confer antiseptic action, anti-inflammatory, anti-edematous, immunomodulatory activity and antimicrobial effects¹³.

J. adstringens Schl. is an endemic plant of Mexico. Its principal compounds are masticadienonic acid; 3 α -hydroxymasticadienonic acid; 3-epi-oleanolic; as well as the sterol beta-sitosterol^{14,15}.

Due to the safety risk of systemic uptake of drugs administered by local delivery^{16,17}, the use of natural, safe plant medication¹¹ provides an attractive alternative for treating oral diseases with potentially high compliance. The plant extracts mentioned in this work are effective in treating various oral disorders such as plaque reduction, candidiasis, canker sores and alveolitis^{15,18,19}.

The aim of this work was to provide a self-bioadhesive film for a topical application that adheres to the oral mucosal tissues and investigate the *in vitro* antimicrobial effects against two pathogenic microorganisms that have been associated with periodontal diseases, in order to assess the potential for developing them into agents that can be used as preventive or treatment therapies, either alone or in combination with conventional treatments.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria Growth conditions

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 were activated in trypticase soy broth and brain heart infusion in the anaerobic chamber and incubated at 35°C for 48 hours in anaerobic and 5% CO₂ atmosphere conditions respectively. For long-term storage, strains were made on glycerol stocks.

Plant material

Different parts of *Thymus vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Croton lechleri*, *Calendula officinalis* L. and *Julliana adstringens* Schl. were collected

and extracted with hydroalcoholic solvents to obtain aqueous and organic extracts.

The extracts were filtered with filters role of Whatman Ltd., sterilized by filtration by 0.22 µm Millipore filters Durapore® GV and stored in sterile amber bottles.

To evaluate the antimicrobial activity of each extract, 1:2 and 1:3 dilutions were prepared and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution technique NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997).

Antimicrobial activity

In vitro antimicrobial activities of aqueous extracts of *T. vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *C. lechleri*, *Calendula officinalis* L., *J. adstringens* Schl and Chlorhexidine 0.12% (as positive control) were evaluated against *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by the microdilution method using 96- well plates. The inoculum was prepared and adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity.- The correct turbidity density was measured at 540nm using a spectrophotometer.

All the extracts were dissolved in trypticase and brain heart infusion broth (for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* respectively) and then serial two-three fold dilutions were made. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 µL of each dilution into double well and adding 100 µL of the inoculum. The final volume in each well was 200 µL. Two wells were left with 200 µL of media, two more with 200 µL of inoculum and two with 200 µL of chlorhexidine (as positive control). The plates were incubated at 35°C for 24 hours according to the requirements of each strain. The MIC was determined from the lowest concentration of extracts to inhibit the growth of microorganisms. Inhibition of proliferation was assessed by optical density measurements (625 nm).

For minimum bactericidal concentrations (MBC), inoculum from clear wells was resuspended in PBS to give a standard concentration of cells (1×10^8) and 10 µL were inoculated into Petri dish pouring molten trypticase or brain heart infusion agar to 45-50°C and swirled to distribute the medium homogeneously. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 hours in anaerobiosis and 5%

CO₂ atmosphere conditions. Absence of bacterial growth noted on the solid medium was considered to be indicative of bactericidal activity of the extracts. Petri dishes containing media and 10 µL of chlorhexidine from the control wells were used as control.

All assays and controls were made three times in triplicate.

Preparation of the polymers

Chitosan with deacetylation degree 85% was purchased from Sigma Chemical CO. St. Louis MO. USA.

Pullulan (molecular weight=200,000) was donated by Hayashibara Company (Okayama, Japan).

Three different formulations of each biopolymer were tested to obtain the best properties (thickness and solubility) for the production of films. 1.0, 1.2 and 0.8 g of chitosan powder were dissolved in 100mL 1% (vol/vol) acetic acid aqueous solution for final concentrations of 1%, 1.2% and 0.8%.

Pullulan was used at 10%, 12% and 10%, plus sorbitol (as plasticizer) dissolved in bidistilled water.

The average pH was 3.9 for chitosan and 5.7 for pullulan. From the three formulations tested, the final selected concentration for chitosan was 1% and 10% plus 0.3% of sorbitol for pullulan. These formulations of biopolymer were added to aqueous extracts in concentrations of about 10% of the MBC of the plants that showed the best antimicrobial activity (*T. vulgaris*, *J. adstringens* Schl and *C. lechleri*) and stirred until the mixture became homogeneous.

The method used was "casting", pouring the formulation into acrylic moulds, spreading the mixture with a spoon and drying at room temperature. Films were recovered manually after 24 hours. Once recovered, the films were cut with a 6 mm diameter hole puncher and stored at 25°C and 25% relative humidity until they were used.

Antimicrobial activity by disc diffusion assay

The discs (6 mm in diameter) of biopolymers with the added extracts where applied by pressing slightly on the solid trypticase and brain heart infusion agar medium inoculated with 1 µL of bacterial suspension (10^8 CFU/mL) of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*. One disc impregnated with chlorhexidine was used as positive reference in each plate. The inoculated plates were

incubated at 37°C for 24 hours in anaerobiosis and 5% CO₂ atmosphere conditions respectively. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zones formed on the media in millimeters with a ruler. All inhibition assays and controls were repeated three times with each test conducted in duplicate. The collected data were analyzed by descriptive statistics ANOVA test using SPSS 17.0 software. The results were presented as mean ±S.D. Statistical significance was accepted at the p<0.05 level.

RESULTS AND DISCUSSION

Periodontal diseases are the most frequent infections in humans. *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are among the microorganisms most commonly identified with the process¹. Increasing resistance to drugs and the side effects of some antibiotics and mouthwashes such as chlorhexidine, used in the treatment of periodontitis, justify the development of novel options as alternative of dental treatments.

Plant extracts used in different countries as traditional medicines have been studied extensively -due to their properties as antimicrobials²⁰. In this work, we tested the antimicrobial activity of aqueous extracts of *T. vulgaris*, *M. chamomilla*, *C. lechleri*, *C. officinalis* and *J. adstringens* Schl. by microdilution and agar diffusion method. The antimicrobial effect of the two biopolymers (chitosan and pullulan) with added aqueous extract of the plants on cultures of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* was tested using the disc diffusion method.

The plants used in this work showed antimicrobial activity against the two oral pathogens tested. Figure 1 shows the results obtained on the inhibitory activity of the different concentrations of *T. vulgaris*, *M. chamomilla*, *C. lechleri*, *C. officinalis* L. and *J. adstringens* Schl. against the tested strains. Our results show that minimal inhibitory concentration (MIC) of *J. adstringens* Schl. was 37 mg/mL for *P. gingivalis* and the same concentration of *C. lechleri* for *A. actinomycetemcomitans*. MIC of *T. vulgaris* and *M. chamomilla* were 62.5 mg/mL for both strains, since *C. officinalis* L. was 62.5 mg/mL for *P. gingivalis* and 250 mg/mL for *A. actinomycetemcomitans* and *C. lechleri* 111 mg/mL for *P. gingivalis*.

1.2 mg/mL of chlorhexidine was effective for both strains.

The MBC value of *J. adstringens* and *C. lechleri* was 37 mg/mL for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* respectively. Concentrations of 62.5 mg/mL of *T. vulgaris* for *P. gingivalis* and *J. adstringens* for *A. actinomycetemcomitans* were needed. MBC of *T. vulgaris* were 111 mg/mL for *A. actinomycetemcomitans* and *C. lechleri* for *P. gingivalis*. *M. chamomilla* required higher concentrations (250 mg/mL) for both microorganisms. MBC of *C. officinalis* was 250 mg/mL for *A. actinomycetemcomitans* and 111 mg/mL for *P. gingivalis*. For chlorhexidine, 1.2 mg/mL was effective for both strains tested (Fig. 2).

Previous works indicate that chitosan and pullulan have certain *in vitro* antibacterial activity²¹.

Other studies show that the exposure of *A. actinomycetemcomitans* to chitosan resulted in the disruption of cell membranes and that it could be considered for the treatment of periodontal diseases²². In this study, we tested the antimicrobial activity of two biopolymers (chitosan and pullulan) with added aqueous extract of *T. vulgaris*, *J. adstringens* Schl. and *C. lechleri* on cultures of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* using the disc diffusion method.

Thickness of chitosan films was an average of 0.03 mm and for pullulan 0.07 mm.

Figure 3 shows the inhibition zones formed by the biopolymers chitosan and pullulan with added aqueous extracts of *T. vulgaris*, *J. adstringens* Schl. and *C. lechleri*, against *A. actinomycetemcomitans* cultures.

For chitosan, the inhibition zones were 4.5 mm without extract (CONTROL), 4 mm with *T. vulgaris*, 4.3 mm with *J. adstringens* Schl., and 6 mm with *C. lechleri*.

For pullulan, the inhibition zones were 9.3 mm without extract (CONTROL), 9.6 mm with *T. vulgaris*, and 7.3 mm with *J. adstringens* Schl.

Figure 4 shows the inhibition zones formed by the biopolymers with plant extracts against *P. gingivalis*.

For chitosan, the inhibition zones were 4 mm without extract (CONTROL), 3 mm with *T. vulgaris*, 3.6 mm with *J. adstringens* Schl. and 4.5 mm with *C. lechleri*.

For pullulan, the inhibition zones were 4 mm without extract (CONTROL), 6 mm with *T. vulgaris* and *C. lechleri*, and 5 mm for *J. adstringens* Schl.

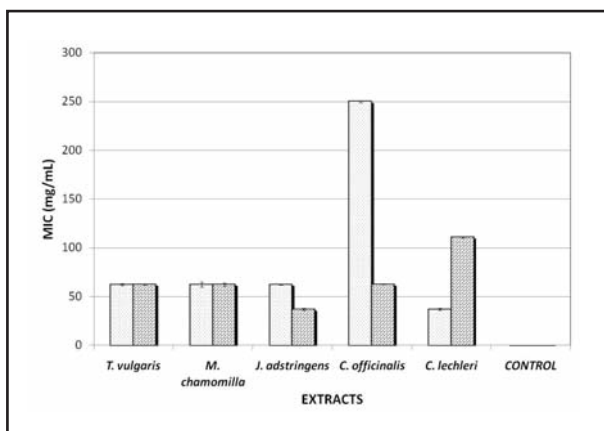


Fig. 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extracts on cultures of periodontopathogen microorganisms tested. ■■■ A. actinomycetemcomitans; ▨ P. gingivalis. CONTROL (chlorhexidine 0.12%).

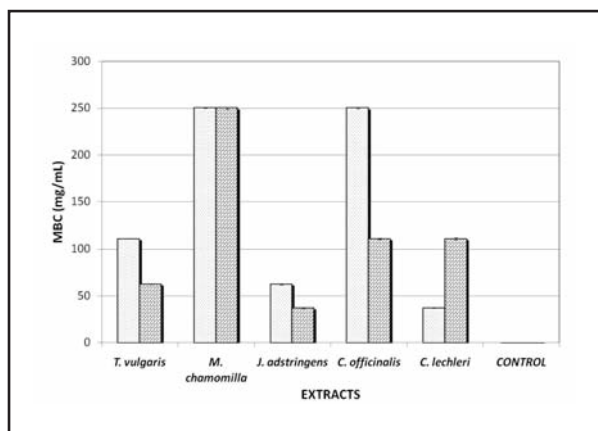


Fig. 2: Minimum bactericidal concentration (MBC) of the plant extracts on cultures of periodontopathogen microorganisms. ▨ A. actinomycetemcomitans; ▨ P. gingivalis CONTROL (chlorhexidine 0.12%).

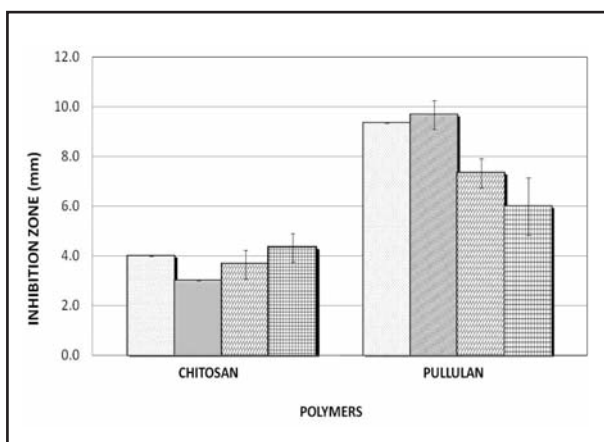


Fig. 3: A histogram plotting the width of the inhibition zones of the biopolymers with aqueous extracts on A. actinomycetemcomitans.

- Polymer without extract (CONTROL)
- ▨ Polymer with T. vulgaris extract
- ▨ Polymer with J. adstringens extract
- ▨ Polymer with C. lechleri extract

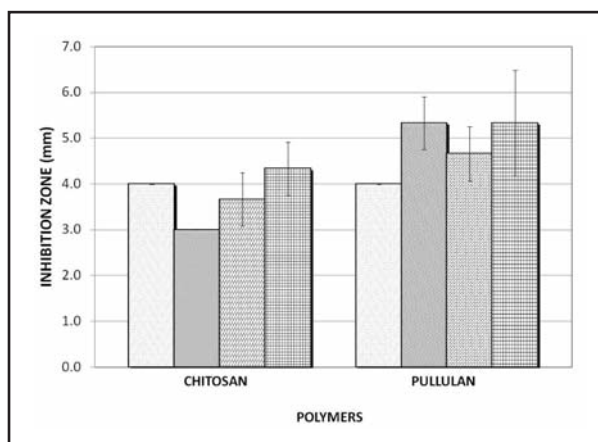


Fig. 4: A histogram plotting the width of the inhibition zones of the biopolymers with aqueous extracts on P. gingivalis.

- Polymer without extract (CONTROL)
- ▨ Polymer with T. vulgaris extract
- ▨ Polymer with J. adstringens extract
- ▨ Polymer with C. lechleri extract

CONCLUSIONS

The findings suggest that the use of pullulan with plant extracts had synergistic effects, enhancing the antimicrobial activity of the films. Chitosan films without extracts showed inhibitory effect against the growth of both strains.

Our results reveal that both biopolymers with added plant extracts have antibacterial activity and can be used as bio-adhesive film against the periodon-

topathogens tested. These *in vitro* data still need to be validated as natural treatment for periodontal diseases by assessing clinical performance.

Data on the antimicrobial activity on pathogens are important for the future application of these polymers and plant extracts in medicine and dentistry, especially for *J. adstringens*, which showed the best result. This is an endemic plant of Mexico which is in danger of extinction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the National Research Council of Mexico (CONACYT) grant #204231. We would like to thank to Hayashibara Co. for the generous donation of Pululan. We also thank Dr. Roberto Mercado and MS. Ismael Malagon for statistical assistance. We appreciate the technical support of Vilma Suarez and Mayra Treviño.

CORRESPONDENCE

Dr. Katiushka Arévalo Niño
 Instituto de Biotecnología - Facultad de Ciencias Biológicas
 Universidad Autónoma de Nuevo León
 Pedro de Alba y Av. Manuel L. Barragán S/N.
 Cd. Universitaria
 San Nicolás de los Garza, NL.
 México. CP. 66450.
 e-mail: karevalo01@hotmail.com

REFERENCES

1. Oral Microbiology and Immunology. Nisengard and Newman. Second Edition. 1994. W. B. Saunders Company.
2. The oral microflora and human periodontal disease. Slots J, Chen C. In: Tannock GW, ed. Medical importance of the normal microflora. 1998. London: Kluwer Academic Publishers. 101-127.
3. Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky S, Uzel N.G, and Steenberghe D. van. Initial Subgingival Colonization of 'Pristine' Pockets. *J Dent Res* 2005; 84:340-344.
4. Slots J, Jorgensen M. Efficient antimicrobial treatment in periodontal maintenance care. *J Am Dent Assoc* 2000; 131:1293-1304.
5. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine. *Periodontol* 2000 2000; 23:9-156.
6. Kurita, K. Chemistry and Application of Chitin and Chitosan. *Polym Degrad Stabil* 1998;59: 117-120.
7. Hu Q, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* 2004; 25:779-785.
8. Leung S-HS, Leone RS, Kumar LD, Kulkarni N. Fast dissolving orally consumable films. *PCT International Application* 2000. WO 00/18365.
9. Nogueira JC, Diniz Mde F, Lima EO. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008; 74:118-124.
10. Ruiz-Bustos E, Velazquez C, Garibay-Escobar A, García Z, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, Hernandez-Martínez J, Robles-Zepeda RE. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *J Med Food* 2009; 12:1398-1402.
11. Tratado de fitofármacos y neutraceuticos. Alonso, J. 1a. Reimpresión corregida y renovada. 2007. Corpus Editorial y Distribuidora.
12. Chen Z, Cai Y, Phillipson J. Studies on the antitumor, antibacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Med* 1994; 60:541-545.
13. Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, Ohmiya A. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.) . *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2005; 69: 2122-2128.
14. Navarrete A, Avula B, Joshi VC, Ji X, Hersh P, Khan IA. Quantitative determination of triterpenes from *Amphitherygium adstringens* by liquid chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations. *Journal - Association of Official Analytical Chemists Int* 2006; 89: 1-7.
15. Cowan, M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology* 1999; 12:564-582.
16. Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol* 2000 1996; 10:139-159.
17. Golomb G, Friedman M, Soskolne A, Stabholz A and Sela MN. Sustained release device containing metronidazole for periodontal use. *Journal of Dental Research* 1984; 63:1149-1153.
18. Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2004; 18:73-78.
19. Olivera Ortega AG, Soto Hernández M, Martínez Vázquez M, Terrazas Salgado T, Solares Arenas F. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphitherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacol* 1999; 68:109-113.
20. More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJ. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 119:473-477.
21. Tin S, Sakharkar K, Lim C, Sakharkar M. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Sciences* 2009; 5:153-160.
22. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 18:553-557.