

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE
Allium Sativum EN *Porphyromonas Gingivalis* Y *Streptococcus*
*Mutans***



**EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF EXTRACT *Allium*
sativum ON *Porphyromonas Gingivalis* AND *Streptococcus Mutans***

**María José Paternina Carballo, Daniela Villarreal Arango, Alejandra Herrera
Herrera, Antonio Díaz Caballero.**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Grupo Interdisciplinario de Investigaciones y Tratamientos Odontológicos
Universidad de Cartagena (GITOUC)**

CARTAGENA

2016

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Allium Sativum* EN
Porphyromonas Gingivalis Y *Streptococcus Mutans***



**ANTIMICROBIAL EFFECT OF EXTRACT *Allium sativum* ON *Porphyromonas
Gingivalis* AND *Streptococcus Mutans***

**María José Paternina Carballo, Daniela Villarreal Arango, Alejandra Herrera
Herrera, Antonio Díaz Caballero*.**

TRABAJO DE GRADO

**ODONTÓLOGO UNIVERSIDAD DE CARTAGENA. ESPECIALISTA EN
PERIODONCIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. MAGISTER EN EDUCACIÓN
UNIVERSIDAD DEL NORTE. DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA. DOCENTE TITULAR UNIVERSIDAD DE
CARTAGENA. DIRECTOR GRUPO DE INVESTIGACIONES GITOU.**

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**Grupo Interdisciplinario de Investigaciones y Tratamientos Odontológicos
Universidad de Cartagena**

CARTAGENA

2016

NOTA DE ACEPTACION

Firma del Presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Cartagena, 24 de noviembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Dios por ser nuestro soporte cada día, por ser la base de todo, gracias a Él por darnos aliento de vida y las fuerzas para despertar cada mañana y seguir luchando por alcanzar nuestro sueño más grande.

A nuestros familiares por brindarnos su apoyo incondicional, porque desde nuestros hogares han luchado con nosotras desde el primer día que iniciamos este largo recorrido y que finalmente estamos culminando.

A nuestros asesores por instruirnos en cada etapa, a Alejandra por explicarnos cada paso, por sus trasnochos y tanto tiempo invertido, a Fang por ser sabio fang y explicarnos las cosas que solamente él y nadie más entendía y al Dr Antonio por recibirnos desde nuestros primeros semestres y por luchar incansablemente para que aprovecháramos nuestro tiempo en la universidad, para hacer más que solo atender pacientes en las clínicas y adentrarnos en el mundo investigativo.

Por ultimo pero no menos importante a nuestras amigas, quienes han vivido en carne propia lo mismo que nosotras, por ser nuestras compañeras de proyectos, aquellas con quienes compartimos durante estos años, por todas las trasnochadas e incluso pijamadas en el laboratorio que nunca olvidaremos.

Agradecemos a la Universidad de Cartagena y a nuestra Facultad de Odontología porque en estos pasillos, salones y clínicas hemos vividos grandes experiencias y sobretodo hemos recibido la formación para lo que seremos el resto de nuestra vida.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. OBJETIVO GENERAL	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MARCO TEORICO	16
5. MATERIALES Y METODOS.....	19
5.1. MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	19
5.2. CEPAS DE MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVOS	19
5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	20
5.4. ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO ..	21
5.5. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE MICROORGANISMOS	21

5.6.	EVALUACION DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (MIC).....	23
5.7.	EVALUACIÓN DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA	24
5.8.	TAMIZAJE FITOQUIMICO PRELIMINAR (TFP) DE EXTRACTOS Y FRACCIONES ACTIVAS Y ANALISIS ESTADISTICO	25
5.9.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	26
6.	RESULTADOS	27
6.1.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	27
6.2.	PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE EXTRACTOS.....	27
6.3.	CULTIVO Y CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	27
6.4.	PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA.....	Error! Bookmark not defined. 29
6.5.	EVALUACION DE LA MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA (MIC) Error! Bookmark not defined.	31
6.6.	MÍNIMA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA.	Error! Bookmark not defined. 32
6.7.	TAMIZAJE FITOQUIMICO PRELIMINAR.....	Error! Bookmark not defined. 35
7.	DISCUSIÓN.....	Error! Bookmark not defined.
8.	CONCLUSIÓN.....	Error! Bookmark not defined. 39
9.	RECOMENDACIONES.....	Error! Bookmark not defined.
10.	BIBLIOGRAFIA.....	41

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Resultados prueba de solubilidad extracto de <i>Allium Sativum</i>	27
Tabla 2. Tiempo de incubación de los ensayos según la curva de crecimiento bacteriano.....	29
Tabla 3. Concentraciones de los extractos en que en la MIC no hubo diferencia significativa.....	32
Tabla 4. Concentraciones mínimas bactericidas obtenidas.....	33
Tabla 5: descripción de análisis fotoquímico preliminar.....	34

LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1 Diseño de placa de poliestireno para evaluación de sensibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas Gingivalis</i> al extracto de <i>Allium Sativum</i>	22
Figura 2 Diseño para MIC de <i>Allium Sativum</i> sobre <i>Porphyromonas Gingivalis</i> y <i>Streptococcus Mutans</i> en placa de poliestireno de 96 pozos.....	23
Figura 3. Procedimiento para realizar la MCB.....	25
Figura 4. Curva de crecimiento graficada de <i>Streptococcus mutans</i>	28
Figura 5. Curva de crecimiento graficada de <i>Porphyromonas Gingivalis</i>	28
Figura 6. Sensibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> a extracto de <i>Allium Sativum</i>	30
Figura 7. Sensibilidad de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> a <i>Allium Sativum</i>	30
Figura 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Allium sativum</i> sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i>	31
Figura 9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Allium sativum</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i>	32
Figura 10. Realización de MCB de <i>Allium Sativum</i> frente a <i>S. mutans</i>	33

RESUMEN

Con el pasar del tiempo se descubrieron múltiples sustancias con componentes naturales que generan un efecto antimicrobiano sobre diversas bacterias presentes en la cavidad oral, siendo útiles para el tratamiento de procesos infecciosos de alta prevalencia como la caries dental y la enfermedad periodontal donde las bacterias mayormente involucradas en el desencadenamiento de estas son *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. Si bien los productos usados para la higiene oral tienen un efecto sobre dichas bacterias a su vez generan efectos adversos a largo plazo debido a sus componentes químicos. **Objetivo:** evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de *Allium Sativum* sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. **Materiales y métodos:** se obtuvo el extracto de *Allium Sativum* por el proceso de maceración de la planta, se sumergió el material triturado en etanol y se filtró, posteriormente el extracto que se obtuvo se evaporó y mediante la técnica de microdilución se determinó la actividad antimicrobiana del *Allium Sativum* en la población cultivada *in Vitro* de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. **Resultados:** el *Allium sativum* mostró una MIC de 500ppm sobre ambas bacterias, mostrando actividad bactericida. **Conclusión:** el extracto etanolico de *Allium sativum* mostró una actividad inhibitoria considerable sobre *S. mutans* (ATCC25175) y *P. gingivalis* (ATCC33277) por lo tanto se recomienda continuar con estudios sobre estas plantas.

Palabras clave (DeCS): Antibacteriano, bacterias, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*.

INTRODUCCION

En la actualidad dos de las patologías que más afecta a los seres humanos, son la caries dental ¹ y la enfermedad periodontal, estas afectan a personas de cualquier edad, raza o sexo; su prevalencia ha tenido un aumento a tal punto que en diversos países es motivo de grave preocupación². La caries dental se define según la OMS como un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y evoluciona hasta la formación de una cavidad³, mientras que la enfermedad periodontal por su parte describe un grupo de infecciones localizadas que afectan los tejidos que soportan a los órganos dentarios, como la gingivitis y la periodontitis, siendo esta última considerada la más grave dentro del grupo.⁴

Aunque la caries y la enfermedad periodontal poseen signos muy distintos, presentan algo en común, su agente causal, siendo éste directamente el biofilm bacteriano, que se acumula en los dientes. Las bacterias que más abundan en estos procesos patológicos son *Streptococcus mutans* en la caries y *Porphyromonas gingivalis* en la enfermedad periodontal. La manera correcta de tratar estas enfermedades es combatiendo dichas bacterias y para esto se han descubierto sustancias que han sido incorporadas en diversos productos de higiene oral y que

¹ DESHPANDE S, KADAM D, INGLE SB. Studies on determination of susceptibility to dental caries among school children. En: International Journal of Pharma & Bio Sciences. 2012;3(2).

² PIHLSTROM BL, MICHALOWICZ BS, JOHNSON NW. Periodontal diseases. En: The Lancet. 2005;366(9499):1809-20.

³ REYNOSO, Victor Manuel Guerrero, et al. Epidemiología de caries dental y factores de riesgo asociados a la dentición primaria en preescolares. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 2009, vol. 66, no 3, p. 10-20.

⁴ ROLÓN LARA MC, SAMUDIO M. KNOWLEDGE. Attitude and practices of Pediatricians on preventive factors of oral Health in early Childhood. *Pediatría (Asunción)*. 2014;41(3):191-200.

muestran buenos resultados pero a su vez muchas generan efectos adversos en los pacientes.^{5, 6, 7}

Por tal motivo se relaciona el uso de plantas con la higiene oral, precisamente para disminuir esta serie de efectos, ya que en la literatura se reporta que los componentes de muchas de las plantas utilizadas como antimicrobianos de origen vegetal resultan efectivas para curar múltiples enfermedades infecciosas alrededor de todo el organismo⁵. *Allium sativum*, comúnmente llamado ajo, es una planta perteneciente a la familia de las Liliáceas. Crece en casi todo el mundo, sobre todo en climas cálidos y templados. Estudios afirman que posee múltiples propiedades: antibacteriana, antiséptica e hipocolesterolemiante; disminuye la agregación plaquetaria, es antimicótica, vermífuga y expectorante. Contiene una sustancia llamada *alicina* que fue descubierta por Cavallito y cols⁸, sulfuros de alilo, vinilo y propilo que dan el olor característico al ajo. Contiene además vitamina A, B1, B2, C, hormonas, acetoina I y II, ácido sulfocianico, una amina del ácido nicotínico, colina, yodo y trazas de uranio⁹. Toda esta compleja mezcla de componentes hace que el bulbo de dicha planta ejerza una variada acción en el organismo. La literatura refiere que la *alicina* exhibe un amplio espectro de actividad antifúngica, especialmente frente a *Cándida albicans*, Actividad antiparasitaria, en algunos protozoarios

⁵ SALAZAR ARANDA, Ricardo, et al. Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. En: Medicina universitaria, 2009, vol. 11, no 44, p. 156-164.

⁶ JAIN, Pranay, et al. Strategies to prevent and treat dental caries and periodontal disease. En: Journal of Pharmacy Research, 2009, vol. 2, no 8, p. 1223-1228.

⁷ AHN, Ki Chang, et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. En: Environ Health Perspect, 2008, vol. 116, no 9, p. 1203-1210.

⁸ CAVALLITO, Chester J.; BAILEY, John Hays. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. En: Journal of the American Chemical Society, 1944, vol. 66, no 11, p. 1950-1951.

⁹ CAHUAS, Carmen Lora, et al. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de *Allium sativum* "ajo" frente a dermatofitos y *Candida albicans*. En: UCV-SCIENTIA, 2015, vol. 2, no 2, p. 23-33.

intestinales humanos, tales como: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; antibacteriana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas como *Salmonella*, diversas especies de *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Capnocytophaga sputigena*.^{10,11}

Por todo lo anterior, como investigadoras de la facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena, buscamos con este estudio conocer a partir del extracto de bulbos de ajo, la actividad antibacteriana de este extracto contra cepas de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* en cultivos *in Vitro*, para que posteriormente se considere la posibilidad de incorporarlos en los productos de higiene oral que utiliza la población diariamente, tales como pasta dental y enjuagues bucales; logrando incrementar la prevención y curación de la caries y la enfermedad periodontal a través del uso de sustancias naturales.

¹⁰ REYES, Ibraín Enrique Corrales. Actividad antimicrobiana y antifúngica de *Allium Sativum* en estomatología. En: 16 de Abril, 2014, vol. 53, no 254, p. 59-68.

¹¹ HUAMANÍ, Seber Augusto Guardia. El ajo y sus efectos antimicrobianos. En: In Crescendo Ciencias de la salud, 2014, vol. 1, no 2.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se presenta la problemática de la poca existencia de alternativas de tratamiento actualizadas para el control químico de los microorganismos responsables de diversas patologías de tipo infeccioso, ya que la implementación de las mismas sustancias a lo largo del tiempo ha propiciado un aumento de la resistencia bacteriana, por lo que se limitan las opciones terapéuticas adicionales al manejo mecánico de la caries dental, la remoción de placa bacteriana y calculo.

2. JUSTIFICACION

Lo primordial en el tratamiento de las enfermedades de tipo cariosas es la implementación de procedimientos de tipo mecánicos, como la eliminación de caries dental y luego de esto la obturación de la cavidad que se ha conformado; el mismo modo en enfermedades de origen periodontal donde se realiza la remoción de cálculo dental y la biopelícula bacteriana, además de la utilización de agentes farmacológicos o desinfectantes, sin embargo estos agentes han generado la aparición de ciertos factores secundarios que conllevan a considerar la posibilidad de tratar las enfermedades más comunes en cavidad oral como lo son la caries dental y la periodontitis, a través de la utilización de nuevos agentes. Por tal razón las nuevas alternativas propenden no provocar los efectos secundarios generados por los agentes usados hasta la actualidad. Es por esto que se pretende hacer del *Allium Sativum* una opción terapéutica para las enfermedades en cavidad oral causadas por *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* debido a que a este se le han atribuido efectos antibacterianos, antifúngicos, antiparasitaria y antivirales, gracias a que se ha demostrado su efecto mediante estudios experimentales, los cuales atribuyeron su actividad a la *Alicina*, un derivado de la *Alina* que se encuentra en el bulbo del ajo, liberada después de la maceración de este. Para finalmente lograr un enfoque y resultados satisfactorios de su utilización en el área odontológica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *Allium Sativum* en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la sensibilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* ante el extracto de *Allium sativum*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto etanólico de *Allium Sativum* en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.
- Determinar la concentración mínima bactericida (MCB) del extracto etanólico de *Allium Sativum* en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.
- Realizar análisis fitoquímico preliminar del extracto de *Allium sativum*.

4. MARCO TEORICO

En el campo de la odontología se ha descubierto la presencia de múltiples patologías en la cavidad oral, unas con mayor grado de prevalencia que otras, con un impacto poblacional en muchos países industrializados y en otros que se encuentran en vía de desarrollo y que pueden agravarse cuando existe la presencia de ciertos factores. Si bien es cierto la cavidad oral provee un microambiente ideal para el crecimiento de múltiples especies bacterianas que residen en ella para conformar la flora normal y otras especies que se asocian a enfermedades.¹²

Entre las patologías que se presentan más frecuentemente podemos resaltar las de tipo infeccioso como lo son la periodontitis y la caries dental^{13,14}, que son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de la biopelícula que se forma naturalmente y ayuda a mantener el estado normal de la cavidad oral.¹⁵

Entre las principales bacterias que desempeñan un rol importante para el desencadenamiento de la caries y la enfermedad periodontal está el *Streptococcus mutans*, es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas, fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido,

¹² DEL ROSARIO AYA, María, et al. Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. En: Revista Colombiana de Investigación en Odontología, 2009, vol. 1, no 1. p. 3-11.

¹³ TELES, Ricardo, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. En: Journal of periodontology, 2010, vol. 81, no 1, p. 89-98.

¹⁴ LIU, Ya-Ling; NASCIMENTO, Marcelle; BURNE, Robert A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. En: International journal of oral science, 2012, vol. 4, no 3, p. 135-140.

¹⁵ OJEDA-GARCÉS, Juan Carlos; OVIEDO-GARCÍA, Eliana; SALAS, Luis Andrés. Streptococcus mutans and dental caries. En: CES Odontología, 2013, vol. 26, no 1, p. 44-56.

su colonización predomina en el biofilm que se encuentra adherido a la estructura dental y es vital para la formación de la caries dental ^{14,16,17}.

También se encuentra la *Porphyromonas gingivalis* que tiene aparición cuando se presentan ambientes anaerobios, y esto es mayormente en el surco gingival donde encuentra las condiciones para su crecimiento¹⁸. Es un bacilo gram negativo, anaerobio estricto, a nivel superficial presenta vesículas que contienen una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos¹⁹, una de ellas llamada colagenasa, la cual tiene capacidad de degradar las fibras colágenas, provocando gran daño y pérdida de los tejidos periodontales por lo que es considerado un comensal en la cavidad oral ^{18, 20}.

La implementación de productos naturales a base de plantas medicinales en el área odontológica ha generado gran impacto, ya que representan una alternativa para el tratamiento de enfermedades orales como las mencionadas anteriormente.

¹⁶ BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. En: Caries research, 2011, vol. 45, no 1, p. 69-86.

¹⁷ RAOULT, Didier; FOTI, Bruno; ABOUDHARAM, Gérard. Historical and geographical parallelism between the incidence of dental caries, Streptococcus mutans and sugar intake. En: European journal of epidemiology, 2013, vol. 28, no 8, p. 709-10.

¹⁸ PERFECTO, Donald Ramos; NAKATA, Hilda Moromi; CADILLO, Elba Martínez. Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. En: Odontología Sanmarquina, 2011, vol. 14, no 1, p. 34-38.

¹⁹ PATHIRANA, Rishi D.; O'BRIEN-SIMPSON, Neil M.; REYNOLDS, Eric C. Host immune responses to Porphyromonas gingivalis antigens. En: Periodontology 2000, 2010, vol. 52, no 1, p. 218-237.

²⁰ CARINCI, Francesco, et al. Oral microflora and periodontal disease: new technology for diagnosis in dentistry. En: Annali di stomatologia, 2013, vol. 4, no 2, p. 170-3.

Como en el caso del llantén (*Plantago major*) que presenta actividad antiinflamatoria en gingivitis inducida tal como lo reporta en su trabajo Garcia G y Col. En 2003 ²¹; o la muña (*Minthostachys griseb*) con actividad antibacteriana frente a seis microorganismos de la microflora oral reportado por Días K, en 2005, citado por Munayco en 2013 ²².

El *Allium sativum* o Ajo como comúnmente se llama, es uno de los medicamentos más antiguos del mundo y ha sido empleado no solo para dar sabor, sino también como una hierba medicinal por sus diversas actividades biológicas, incluyendo anticariogénica, antiaterosclerótica, antitrombótica, antimicrobiana, antiinflamatoria y efecto antioxidante²³.

En 2013 Munayco realizó un estudio sobre el efecto antimicrobiano del extracto de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad oral, entre las cuales se encontró *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *C. albicans* y *Lactobacillus casei*, de estos solo el *Lactobacillus casei* presentó resistencia, en este estudio se determinó que la concentración antimicrobiana frente al *S. mutans* fue de 90mg/ml y 120mg/ml, donde presentó una mejor actividad a la concentración de 120mg/ml²¹.

Por todo lo anterior surgió la pregunta ¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto de *Allium sativum* sobre cepas ATCC de *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*?

²¹ VILLALOBOS, Octavio José, et al. Efecto de un enjuague bucal compuesto de aloe vera en la placa bacteriana e inflamación gingival. En: Acta odontol. venez, 2001, vol. 39, no 2, p. 16-24.

²² PANTOJA, Evelyn Munayco; NAKATA, Hilda Moromi. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. En: Odontología Sanmarquina, 2013, vol. 16, no 2, p. 21-24.

²³ CAPASSO, Anna. Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. En: Molecules, 2013, vol. 18, no 1, p. 690-700.

5. MATERIALES Y METODOS

Tipo de estudio: experimental *In vitro*

5.1 MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

La planta *Allium Sativum* se recolectó en diferentes zonas rurales del departamento de Bolívar, en la Costa Caribe Colombiana. Se recolecto un total de 2kg de bulbos de *Allium Sativum*. De esta planta se hizo extracto de los bulbos, los cuales fueron triturados y embebidos en etanol a temperatura ambiente durante 72 h en condiciones de oscuridad y después se filtró. El extracto total se secó, y el disolvente se evaporó en un evaporador rotatorio (Laborota 4001, Heidolph) bajo presión reducida a 50°. Al obtener el extracto se realizó la prueba de solubilidad con diferentes solventes: Etanol, DMSO y Agua destilada.

5.2 CEPAS DE MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVOS

Se emplearon cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Americam Type Culture Collection).

Para el cultivo de la *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277) se preparó agar Brucella suplementado con hemina (5ug/ml), vitamina K (1mg/ml) y 5% de sangre lacada. Se siguieron las indicaciones del proveedor de la bacteria, esta se preservó a -20°C hasta su utilización, una vez se sacó del congelador se esperó a que alcanzara una temperatura ambiente. Se aseguraron unas condiciones asépticas para sacar el stick de su empaque en una cabina de flujo laminar vertical, se hizo

presión para que el hisopo entrara en contacto con la bacteria, se removió el hisopo del stick y se hicieron movimientos en forma de espiral de afuera hacia adentro en el agar anteriormente mencionado contenido en las cajas de Petri. Las cajas se introdujeron en una jarra de anaerobiosis con un Anaerogen (Oxoid® UK) para asegurar que se encontrara en óptimas condiciones, la jarra fue rotulada con la bacteria y la fecha, luego fue llevada a la incubadora a una temperatura constante de 37°C por un periodo de tiempo de 7 días, transcurrido este tiempo se observó crecimiento de la bacteria.

El *Streptococcus mutans* se cultivó a 37°C en condiciones aerobias en agar de Trypticase soya suplementado con extracto de levadura, agar-agar, Sucrosa y Bacitracina (TYS20B). Para realizar el cultivo de la bacteria, al igual que la *Porphyromonas* se tuvo en cuenta las indicaciones dadas por el proveedor, esta se preservó a -20°C hasta su utilización, una vez se sacó del congelador se esperó a que alcanzara una temperatura ambiente. Se aseguraron condiciones asépticas y se esparció la bacteria en forma de espiral sobre el agar en las cajas de Petri. Las cajas fueron marcadas con el nombre de la bacteria, fecha de cultivo, se introdujeron en una jarra de anaerobiosis con un Anaerogen (Oxoid® UK) para ser llevadas a la incubadora por un periodo de 48 horas a una temperatura constante de 37°C.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para cada ensayo, las cepas bacterianas se sembraron en el agar indicado mencionado anteriormente; se tomaron de las cajas de petri 3-4 colonias bien diferenciadas, inoculándose en tubos de ensayo con 8 mL de caldo nutritivo, para *Streptococcus mutans* fue caldo tripticase de soya suplementado con extracto de levadura, sucrosa y bacitracina, para *Porphyromonas gingivalis* se preparó caldo Brucella suplementado con hemina (5ug/ml), vitamina K (1mg/ml) y 5% de sangre humana, se llevaron los tubos a 37 °C por 1-2 horas, luego se verificó a 620 nm,

que la solución del inóculo presentó una absorbancia semejante a la escala 0,5 de Mc Farland (0,08–0,10) haciendo uso de un espectrofotómetro de microplacas Multiskan EX (Thermo®, UK). Pasados 15 minutos se realizó una dilución del inóculo previamente homogenizado en caldo Mueller-Hinton estéril, hasta que se obtuvo una concentración final en el pozo de 5×10^5 UFC/ mL. (NCCLS, 2003).

5.4 ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Para *Streptococcus mutans* se realizó prueba en caldo Mueller Hinton, adicionando por sextuplicado, 100 ML/pozo de cada inóculo diluido en placas de poliestireno (96 pozos) y realizando mediciones a 620 nm a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 24 y 48 horas de incubación para la obtención de la curva de crecimiento de esta bacteria. Se utilizaron como controles pozos con caldo Mueller Hinton sin bacterias.

Así mismo para la *Porphyromonas gingivalis* se realizó curva de crecimiento, haciendo uso del caldo Brucella diluido en placas de poliestireno (96 pozos) con un tiempo de lectura también de 48horas.

5.5 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE MICROORGANISMOS

Una vez comprobado el crecimiento de los inóculos en el medio seleccionado para las pruebas, se procedió a la preparación de diluciones seriadas de los extractos de *Allium Sativum*.

Dichas diluciones se prepararon en agua destilada, partiendo de una concentración de 100.000ppm tomando 60mg de extracto y 600µL de agua destilada que es el solvente en un eppendorf estéril de 1,5mL.

Para el desarrollo de la prueba de sensibilidad se adicionaron por cuadruplicado en la placa de 96 pozos, muestras a una concentración de 512 Mg/mL. Para hacer la evaluación de la sensibilidad de las bacterias se utilizó una concentración de 500ppm para el extracto de *Allium Sativum*. De la solución stock que estaba a una concentración de 100.000ppm se tomaron 10µL y se vertieron en un eppendorf estéril de 1,5ml el cual contenía 990µL de agua destilada, con esto se obtuvo una concentración de 1000ppm, luego se llegó a una concentración de 500ppm al tomar 500µL de la concentración y adicionando agua destilada para disminuir la concentración.

Siguiendo el orden metodológico, se realizó el diseño de la placa de poliestireno de 96 pozos con controles de esterilidad, color y crecimiento tanto positivo como negativo con gentamicina a 16ppm, agregando en último lugar el inóculo de bacterias a la placa de 96 pozos. Diseño para *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* se ilustra en la **figura 1**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	AGUA 100µl						CALDO 100µL						
B	50 µl de agua + 50 µl de extracto 500 ppm				50 µl de agua + 50 µl de extracto 1000 ppm				50 µl de agua + 50 µl de extracto 2000 ppm				
C	50 µl de agua + 50 µl de extracto 4000 ppm				50 µl de gentamicina + 50 µl de inóculo				50 µl de agua + 50 µl de inóculo				
D	50 µl de extracto 5000 ppm + 50 µl de inóculo						50 µl de extracto 1000 ppm + 50 µl de inóculo						
E	50 µl de extracto 2000 ppm + 50 µl de inóculo						50 µl de extracto 4000 ppm + 50 µl de inóculo						
F	50 µl de inóculo + 50 µl de agua												
G													
H													

Figura 1 Diseño de placa de poliestireno para evaluación de sensibilidad de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* al extracto de *Allium Sativum*.

Luego las placas preparadas se llevaron a incubación en condiciones anaerobias en una jarra de anaerobiosis utilizando el sistema de bolsas Anaerogen (Oxoid® UK) por un periodo de 13 horas para *Streptococcus mutans* y de 22 horas para *Porphyromonas gingivalis*. Al cumplirse este tiempo se realizó la medición de la observación haciendo uso de un lector de microplacas Multiskan EX (Thermo®, UK).

5.6 EVALUACION DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (MIC)

Se prepararon 14 concentraciones diferentes del extracto de *Allium Sativum* a partir de 500ppm hasta llegar a una concentración de 0.06ppm, para preparar las diferentes concentraciones se tomaron 500µL del extracto a 1000ppm, se depositaron en un eppendorf y a este se le agregaron 500µL de agua para disminuir la concentración a la mitad, obteniendo dos tubos, uno para el estudio y otro para la preparación de la disolución siguiente, así se hizo hasta alcanzar la mínima concentración (0.06ppm).

Se realizó la prueba de microdilución en caldo para probar los extractos, haciendo uso de placas de poliestireno de 96 pozos con el diseño para el extracto. Diseño de la MIC en la figura 2

	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12
A	50 µl caldo + 50µL ext 500ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 500ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 1,95ppm				50 µl caldo + 50µL ext 1,95ppm		
B	50 µl caldo + 50µL ext 250ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 250ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 0,97ppm				50 µl caldo + 50µL ext 0,97ppm		
C	50 µl caldo + 50µL ext 125ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 125ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 0,48ppm				50 µl caldo + 50µL ext 0,48ppm		
D	50 µl caldo + 50µL ext 62,5ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 62,5ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 0,4ppm				50 µl caldo + 50µL ext 0,4ppm		
E	50 µl caldo + 50µL ext 31,25ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 31,25ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 0,12ppm				50 µl caldo + 50µL ext 0,12ppm		
F	50 µl caldo + 50µL ext 15,62ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 15,62ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 0.06ppm				50 µl caldo + 50µL ext 0.06ppm		
G	50 µl caldo + 50µL ext 7,81ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 7,81ppm		50µL gentamicina +50µL inoculo			100µL Caldo			
H	50 µl caldo + 50µL ext 3,90ppm		50 µl inoculo + 50µL ext 3,90ppm		100µL inoculo			100µL Agua			

Figura 2. Diseño para MIC de *Allium Sativum* sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* en placa de poliestireno de 96 pozos.

Una vez preparadas las placas se llevaron a la incubadora a 37°C en condiciones de anaerobiosis haciendo uso del sistema de bolsas de Anaerogen (Oxoid® UK) por 13 horas para *Streptococcus mutans* y de 22 horas para *Porphyromonas gingivalis*. De la misma forma en que se evaluó la sensibilidad se llevaron las placas al Multiskan EX (Thermo®, UK) para su lectura.

5.7 EVALUACION DE LA MINIMA CONCENTRACION BACTERICIDA (MCB)

La concentración mínima bactericida (MCB) de los extractos de la planta de estudio fue determinada mediante el método descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, en donde las muestras seleccionadas fueron aquellas concentraciones que no demostraron crecimiento bacteriano durante la determinación de la CMI (no existencia de diferencia significativa entre la densidad óptica de las muestras y el caldo).

Para esto se procedió a tomar una asada de los pozos que las contenían, realizando un subcultivo en cajas de Petri con agar correspondiente para cada bacteria (con los pozos de control positivo y negativo también se efectuó esta misma operación). Las cajas de Petri inoculadas se incubaron en anaerobiosis dependiendo de la bacteria a 37°C (Figura 3). Luego de este periodo se observó la existencia o no de crecimiento de colonias bacterianas y se clasificaron los extractos como bacteriostáticos (aquellos en los que se observaron crecimiento bacteriano en el subcultivo) o bactericida (aquellos en los que no se observaba crecimiento bacteriano).

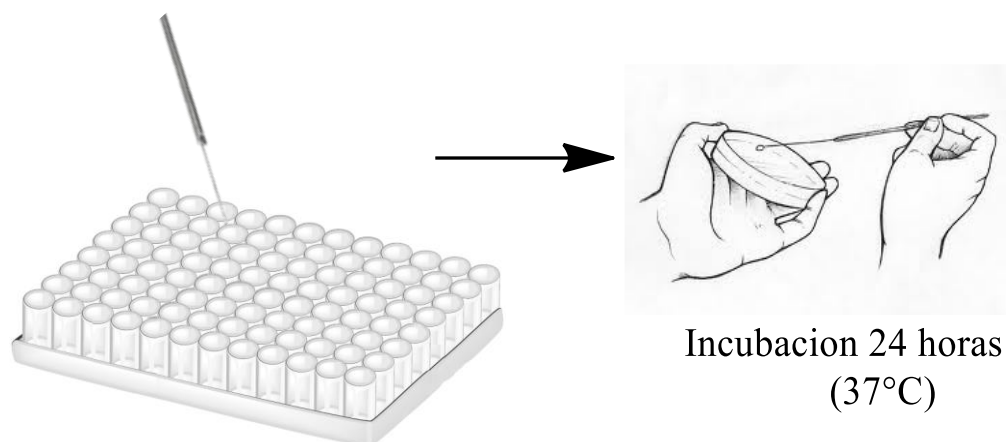


Figura 3. Procedimiento para realizar la CMB.

5.8 TAMIZAJE FITOQUIMICO PRELIMINAR (TFP) DE EXTRACTOS Y FRACCIONES ACTIVAS

El TFP se le efectuó al extracto de *Allium sativum*, para esto se realizaron pruebas de identificación para cada uno de los siguientes grupos de metabolitos: alcaloides, azucares reductores, cardiotónicos, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, leucoantocianidinas, saponinas, taninos y tripenos/ esteroide. Esta prueba indicó cuales de los metabolitos secundarios ejercen acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial sobre los organismos vivos y a su vez a que componentes del extracto es atribuible la acción antibacteriana.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en la evaluación de las curvas de crecimiento bacteriano, pruebas de sensibilidad y MIC, se analizaron y graficaron utilizando el software

Graphpad Prism 5.01, en este se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un post-test de Dunnett para llevar a cabo las comparaciones múltiples y con un grado de confianza considerando que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control es significativa cuando $P < 0.05$ (95% de confianza). Los datos se graficaron como la media \pm la desviación estándar de la media. Previo al análisis se realizó test de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, con el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20 (IBM®), observando una distribución normal de los datos.

5.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Con base al artículo 67 de la resolución 008430 de 1993 del ministerio de salud de Colombia, el proyecto se categorizo como grupo de riesgo número uno los microorganismos representaron un mínimo riesgo para el individuo y para la comunidad, por lo tanto pueden manipularse en laboratorios tipo básico de microbiología.

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCION DEL EXTRACTO

Se obtuvo del extracto de *Allium Sativum* una cantidad de 200 gr la cual fue suficiente para la realización de los ensayos; presentó una consistencia viscosa y una coloración oscura y no presentaba sensibilidad a la luz.

6.2 PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO

En la tabla 1 se encuentran los resultados de la prueba de solubilidad realizada al extracto de *Allium sativum*; en este se observa que el mejor solvente para dicho extracto fue el agua, mientras que el etanol resultó medianamente soluble, por último se concluyó que este extracto es muy poco soluble en DMSO.

EXTRACTO	SOLVENTE	
<i>Allium sativum</i>	DMSO 1%	+
	Etanol 1%	++
	AGUA	+++

Tabla 1. Resultados prueba de solubilidad extracto de *Allium Sativum*

6.3 CULTIVO Y CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Atendiendo a la metodología establecida se observó un abundante crecimiento bacteriano transcurrido el tiempo requerido para cada bacteria.

Se estableció la curva de crecimiento de las bacterias, donde se detalla el comportamiento de estas durante su periodo de incubación, alcanzando su pico de crecimiento a las 13 horas para el *Streptococcus mutans* (Figura 4) y 22 horas para *Porphyromonas gingivalis* (Figura 5)

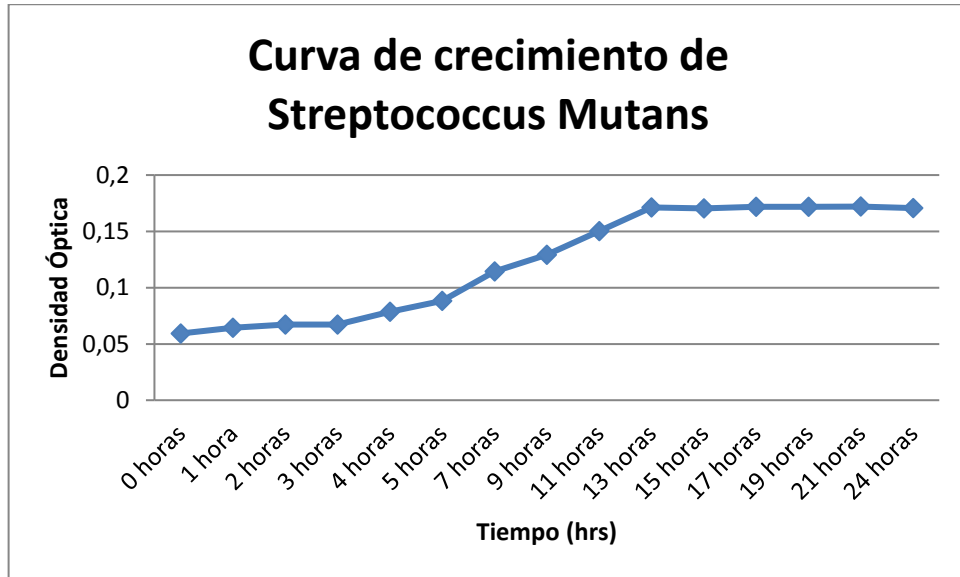


Figura 4. Curva de crecimiento graficada de *Streptococcus mutans*

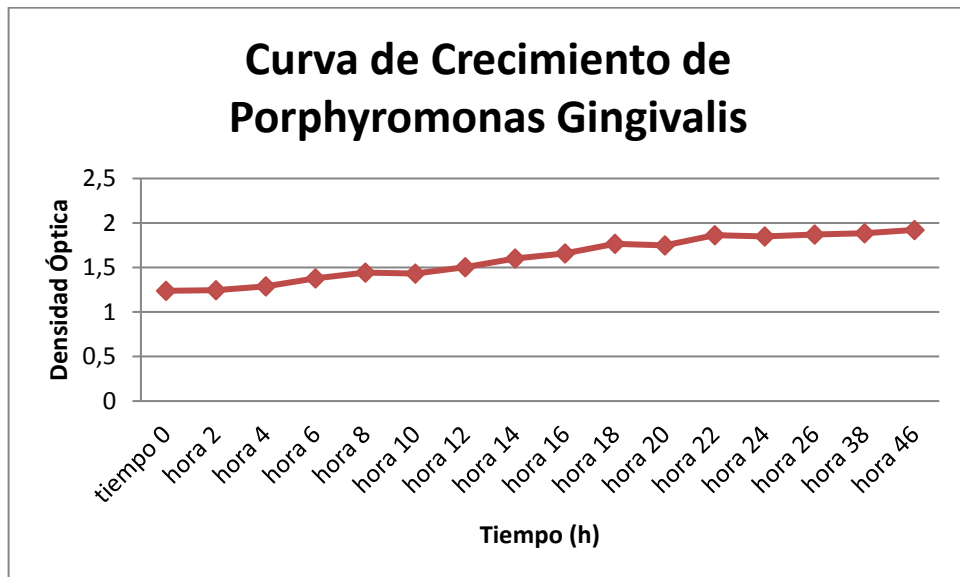


Figura 4. Curva de crecimiento graficada *Porphyromonas Gingivalis*.

Según lo anterior se puede calcular el tiempo de medición para las pruebas de sensibilidad bacteriana y determinación de la concentración mínima inhibitoria, como se muestra en la tabla 2.

Bacteria	Tiempo total curva de crecimiento	Tiempo de incubación según curva de crecimiento
<i>S. mutans</i>	24 horas	13 horas
<i>P. gingivalis</i>	46 horas	22 horas

Tabla 2. Tiempo de incubación de los ensayos según la curva de crecimiento bacteriano.

6.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

Se realizaron las pruebas de sensibilidad del extracto frente a las diferentes cepas; el extracto fue evaluado a una concentración en pozo de 500ppm, 1000ppm, 2000ppm y 4000pm, cada concentración de extracto fue evaluada junto a controles positivos de crecimiento (inoculo), controles negativos de crecimiento (genamicina), controles de esterilidad (caldo y agua esteriles) y controles de blanco de cada extracto (background: extracto o fracción con caldo) para cada una de las cepas correspondientes.

En las figuras 6 y 7 se observan los resultados de la prueba de sensibilidad de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* respectivamente.

Sensibilidad de *Streptococcus mutans* a *Allium sativum*

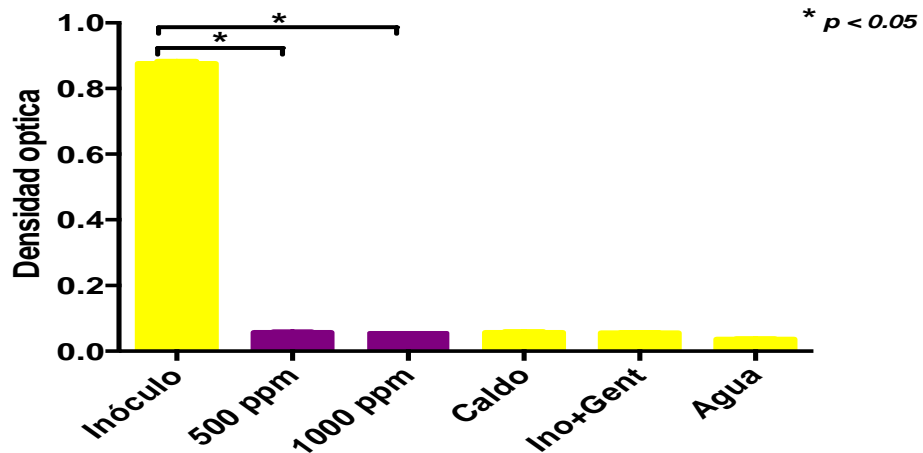


Figura 5. Sensibilidad de *Streptococcus mutans* a extracto de *Allium Sativum*. El valor de p se consideró como $p < 0,05$.

Sensibilidad de *Porphyromonas gingivalis* a *Allium sativum*

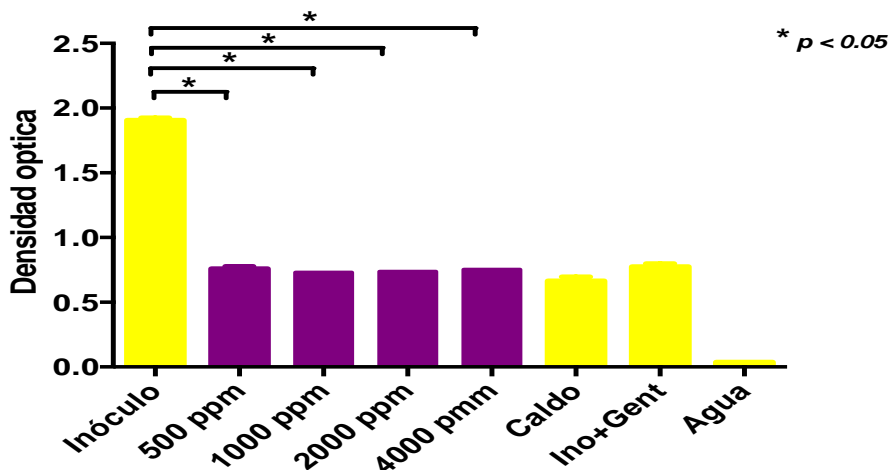


Figura 6. Sensibilidad de *Porphyromonas Gingivalis* a *Allium Sativum*. El valor de p se consideró como $p < 0,05$.

Después de realizada la prueba se determinó que el extracto en *S. mutans* y en *P. gingivalis* es sensible, ya que mostraron diferencia estadísticamente significativa en

comparación con el inoculo, por lo que fue considerado para la realización de la MCI.

6.5 EVALUACION DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)

Es necesario destacar que si el extracto posee una MIC igual o menor a 1000ppm puede ser considerado como promisorio debido a que estas concentraciones se encuentran buenas para hacer extractos totales obtenidos.

Con base en lo anterior luego de tomar 14 concentraciones los resultados arrojaron lo siguiente: es considerado como promisorio el extracto de *Allium sativum* frente a las cepas de *S. mutans* y *P. gingivalis* puesto que presenta una MIC de 500ppm (Figura 8 y 9)

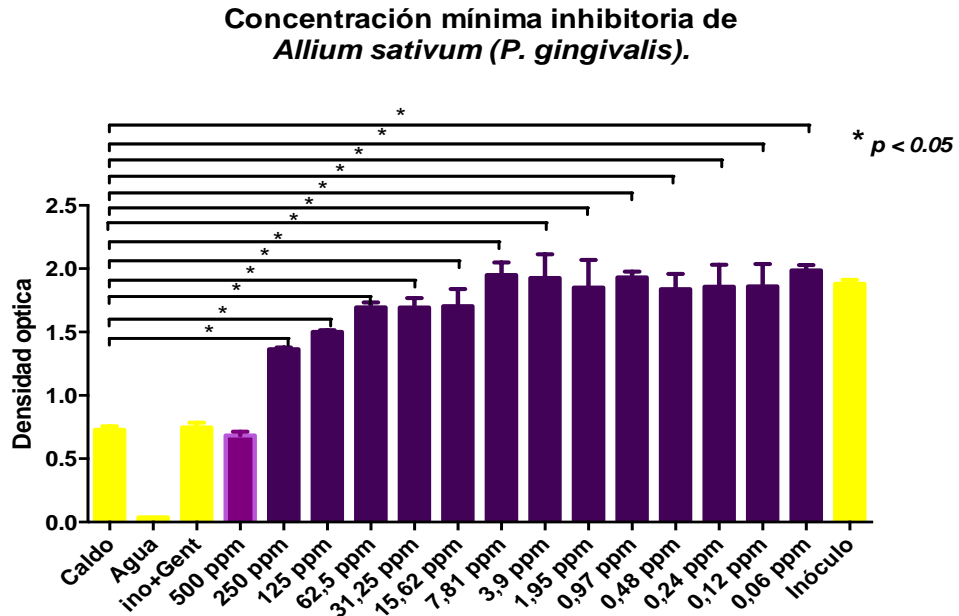


Figura 7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Allium sativum* sobre *Porphyromonas gingivalis*.

**Concentración mínima inhibitoria de
Allium sativum (*S.mutans*).**

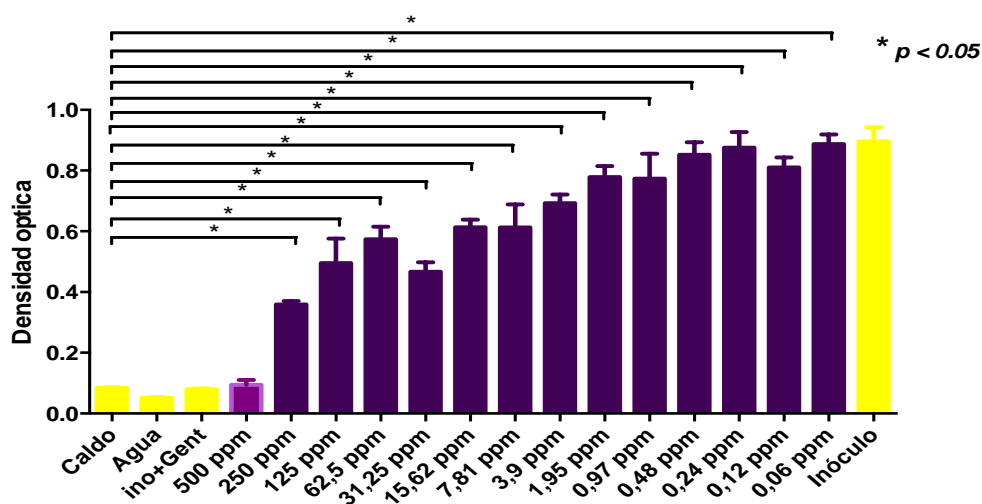


Figura 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Allium sativum* sobre *Streptococcus mutans*.

Se observó que la MIC del extracto ante ambas bacterias fue a 500ppm ya que no hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto al caldo.

6.6 EVALUACION DE LA MINIMA CONCENTRACION BACTERICIDA (MCB)

Con base en los resultados obtenidos de la MIC se inoculó en el agar correspondiente para cada bacteria una asada de los pozos donde no se encontró diferencia significativa con el caldo, lo cual se observa en la tabla 3.

Extracto	Bacterias	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Allium Sativum</i>	500ppm	500ppm

Tabla 3. Concentraciones de los extractos en que en la MIC no hubo diferencia significativa.

Los resultados de la MCB se observan en la tabla 4.

Extracto	CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA de <i>S. mutans</i>
<i>Allium sativum</i>	500ppm

Tabla 4. Concentración mínima bactericidas obtenida

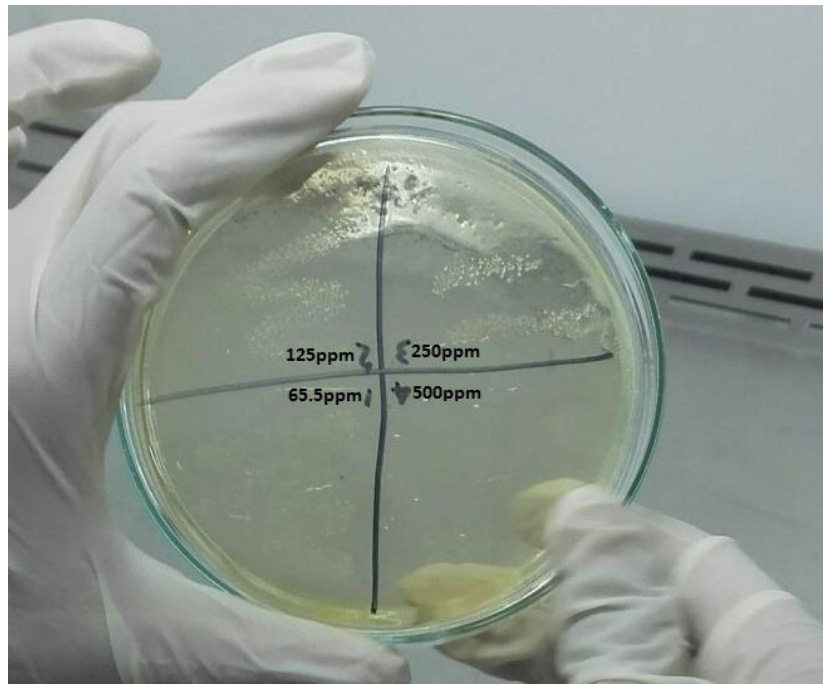


Figura 9. Realización de MCB de *Allium Sativum* frente a *S. mutans* a 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm y 65.5 ppm.

Según lo observado a la MCB obtenida de *Allium sativum* frente a *S. mutans* este es bactericida a concentraciones iguales o superiores a 500ppm y frente a *Porphyromonas gingivalis* no fue posible establecer la MCB ya que se presentó contaminación de la muestra con hongo en repetidas ocasiones.

6.7 TAMIZAJE FITOQUIMICO PRELIMINAR

A la realización del tamizaje preliminar fotoquímico se pudo observar que el grupo de metabolitos más abundante es de la serie cumarinica, mientras que los alcaloides, los azúcares reductores, compuestos fenólicos, flavonoides, leucoantocianidinas, taninos se encuentran ausentes; por tal motivo es factible atribuir la actividad antibacteriana a las cumarinas principalmente; sin descartar que pueden estar presentes otros grupos de metabolitos teniendo en cuenta que este tamizaje es “preliminar”, por tal razón para atribuirle con certeza toda la actividad antibacteriana a este compuesto y conocer su mecanismo de acción es necesario realizar estudios posteriores.

Extracto	Órgano	AL	AR	CA	CF	CU	FL	LE	SA	TA	TE
Allium sativum	bulbos	-	-	++	-	+++	-	-	++	-	+

Tabla 5: descripción de análisis fitoquímico preliminar

AL: alcaloides; **AR:** Azúcares reductores; **CA:** Cardiotónicos; **CF:** Compuestos Fenolicos; **CU:** cumarinas; **FL:** flavonoides; **LE:** Leucoantocianidinas; **SA:** saponinas; **TA:** taninos; **TE:** triterpenos/esteroide. **ND:** no determinado, por interferencia de color

Presencia abundante [+++], presencia moderada [++], presencia leve [+], ausencia [-].

7. DISCUSION

En el presente estudio se llevó a cabo la evaluación del extracto de la planta *Allium Sativum* más conocida como ajo, buscando identificar que efecto tiene esta sobre bacterias de la cavidad oral como lo son *Porphyromonas Gingivalis* predominante en la enfermedad periodontal y *Streptococcus Mutans* presente en los procesos cariosos que se dan en la estructura dental.

Es importante saber que todas las plantas son capaces de sintetizar los productos que requieren para su crecimiento y desarrollo por medio de rutas metabólicas y estas rutas se conocen como metabolitos primarios y secundarios, los cuales a su vez le atribuyen características y propiedades especiales a la planta.²⁴ Las plantas medicinales a partir del metabolito primario son capaces de sintetizar los metabolitos secundarios los cuales ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre los organismos vivos.²⁵

En este estudio se realizó un tamizaje fotoquímico preliminar para determinar cuál es el metabolito secundario presente más abundantemente en el *Allium sativum*, siendo en este caso las Cumarinas. Según Domingo y Lopez Brea en 2003 las cumarinas son compuestos derivados de la benzo-a-pirona, están presentes en diversas plantas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitromboticas y vasodilatadoras, mientras que Garcia Suarez en 2014 afirma que las cumarinas actúan principalmente como antibióticos²⁴, dándole soporte al resultado obtenido con el tamizaje preliminar realizado en el presente estudio.

Allium Sativum es una planta originaria de Asia, ésta contiene diversos compuestos sulfurados que le aportan características particulares, uno de ellos es la *alicina*, que genera la mayor parte del efecto antimicrobiano en la planta como lo reportan

²⁴ SUÁREZ, María Dolores García, et al. Metabolitos secundarios vegetales con importancia natural y biomédica; fenilpropanoides con actividad estrogénica. En: Jonatan Torres Pérez (Coordinadores), p. 75-91.

²⁵ DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. En: Rev Esp Quimioterap, 2003, vol. 16, no 4, p. 385-393.

Domingo y López en 2003 en su revisión, pero cabe destacar que gracias a este compuesto el ajo debe usarse en cantidades controladas porque puede provocar efectos adversos como irritación de las mucosas, sensación de ardor, molestias digestivas y diarrea tal como lo reportan Amagase et al en 2001.²⁶

En estudios previos como el de Xiaonan Et al en 2011²⁷, se evaluó la actividad antimicrobiana de *Allium sativum* sobre distintas bacterias, una de ellas es el *Campylobacter jejuni*, notando que el efecto bactericida de la planta aumenta conforme se agrega mayor cantidad, por otra parte Arroyo y Cols. en 2015²⁸ confirman que la planta a una concentración de 10% muestra actividad *in vitro* para inhibir el crecimiento de bacterias como *Escherichia Coli* y *Salmonella enteritidis*,

Pantoja en 2013²² evaluó el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* estudiando el diámetro de los halos de inhibición formados por el extracto a las diferentes concentraciones, por tanto su estudio no aporta información importante como la concentración necesaria para que hubiese actividad antibacteriana, a diferencia de la metodología empleada en el presente estudio, donde se evaluó el efecto antibacteriano por la determinación de la MIC y MCB. Otro estudio en el que se evaluó el efecto del ajo sobre cepas bacterianas es el realizado por García en 2007²⁹, en éste el extracto que se usó fue acuoso mientras que en el presente estudio se hizo uso del extracto etanólico de la planta.

²⁶ AMAGASE, Harunobu, et al. Intake of garlic and its bioactive components. En: The Journal of nutrition, 2001, vol. 131, no 3, p. 955S-962S.

²⁷ LU, Xiaonan, et al. Investigating antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*) concentrate and garlic-derived organosulfur compounds on *Campylobacter jejuni* by using Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, and electron microscopy. En: Applied and environmental microbiology, 2011, vol. 77, no 15, p. 5257-5269.

²⁸ ARROYO, LANDÍN, ALONSO, SÁNCHEZ y SUÁREZ. Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. En: Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan. 2015; 3(5): 1045-1052.

²² PANTOJA, Evelyn Munayco; NAKATA, Hilda Moromi. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. En: Odontología Sanmarquina, 2013, vol. 16, no 2, p. 21-24.

²⁹ GARCIA Rico; ARIAS, HERRERA FC. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*:

Se consideró acertada la metodología planteada, pues se han realizado muchos estudios sobre plantas con el fin de buscar su actividad antibacteriana, a través de la determinación de la MIC y MCB, como por ejemplo en el estudio realizado por More y colaboradores en el 2008 titulado “Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms”, en donde evaluaron diferentes extractos sobre cepas bacterianas de importancia odontológica, determinando las MIC y MCB para cada una de ellas, por lo que concluyeron que en realidad presentaban actividad antibacteriana sobre bacterias orales ³⁰.

A través de los estudios realizados se observó que el extracto fue activo sobre ambas bacterias a una concentración de 500ppm, lo que indicó que este es de notable relevancia atendiendo a lo planteado por Van Vuuren en 2008, quien realizó una revisión de varios estudios sobre la evaluación de la MIC de algunas plantas medicinales, estableciendo que las concentraciones con una actividad por debajo de 1000 ppm son de gran importancia médica y farmacológica. ³¹

estudio preliminar in vitro. En: Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 2007, vol. 5, no 2, p. 68-79.

³⁰ MORE G, TSHIKALANGE TE, LALL N, BOTHA F, MEYER JJ. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. En: Journal of ethnopharmacology. Octubre 2008. Vol. 119, no. 3, p. 473-7.

³¹ VAN Vuuren SF. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. En: Journal of ethnopharmacology. Octubre 2008. Vol. 119, no. 3, p. 462-72.

8. CONCLUSIONES

Después de realizar el presente estudio es posible destacar ciertas consideraciones como son:

- El extracto de *Allium Sativum* presento actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas Gingivalis* ATCC33277 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- El *Streptococcus mutans* como la *Porphyromonas gingivalis* son igual de susceptibles al extracto de *Allium Sativum*
- Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en este trabajo permiten decir que el uso de *Allium Sativum* frente a *Porphyromonas Gingivalis* ATCC33277 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175 presenta efectos promisorios para continuar estudios con esta planta.
- El uso de *Allium Sativum* frente a *Streptococcus mutans* presenta efecto bactericida a una concentración de 500 ppm.

9. RECOMENDACIONES

Una vez finalizado el presente estudio se realizan las siguientes recomendaciones con el propósito de mejorar la calidad e impacto de los resultados obtenidos hasta este momento:

- Aumentar el número de cepas bacterianas y microorganismos a utilizar
- Realizar la Mínima Concentración Bactericida para *Porphyromonas gingivalis*
- Realizar un análisis cromatográfico a través del cual se conoce con mayor veracidad que fracción del extracto produce el efecto antibacteriano.
- Evaluar la actividad antibacteriana del material vegetal utilizado en este estudio sobre bacterias aisladas de pacientes en cavidad oral.

10. BIBLIOGRAFIA

AHN, Ki Chang, et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. En: Environ Health Perspect, 2008, vol. 116, no 9, p. 1203-1210.

AMAGASE, Harunobu, et al. Intake of garlic and its bioactive components. En: The Journal of nutrition, 2001, vol. 131, no 3, p. 955S-962S.

ARROYO, LANDÍN, ALONSO, SÁNCHEZ y SUÁREZ. Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. En: Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan. 2015; 3(5): 1045-1052

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. En: Caries research, 2011, vol. 45, no 1, p. 69-86.

CAHUAS, Carmen Lora, et al. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de *Allium sativum* "ajo" frente a dermatofitos y *Candida albicans*. En: UCV-SCIENTIA, 2015, vol. 2, no 2, p. 23-33.

CAPASSO, Anna. Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. En: Molecules, 2013, vol. 18, no 1, p. 690-700.

CARINCI, Francesco, et al. Oral microflora and periodontal disease: new technology for diagnosis in dentistry. En: Annali di stomatologia, 2013, vol. 4, no 2, p. 170-3.

CAVALLITO, Chester J.; BAILEY, John Hays. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. En: Journal of the American Chemical Society, 1944, vol. 66, no 11, p. 1950-1951.

DEL ROSARIO AYA, María, et al. Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. En: Revista Colombiana de Investigación en Odontología, 2009, vol. 1, no 1. p. 3-11.

DESHPANDE, S. N.; KADAM, D. G.; INGLE, SACHIN B. Studies on determination of susceptibility to dental caries among school children. En: International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2012, vol. 3, no 2, p. 809-817.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. En: Rev Esp Quimioterap, 2003, vol. 16, no 4, p. 385-393.

GARCIA Rico; ARIAS, HERRERA FC. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. En: Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 2007, vol. 5, no 2, p. 68-79.

HUAMANÍ, Seber Augusto Guardia. El ajo y sus efectos antimicrobianos. En: In Crescendo Ciencias de la salud, 2014, vol. 1, no 2.

JAIN, Pranay, et al. Strategies to prevent and treat dental caries and periodontal disease. En: Journal of Pharmacy Research, 2009, vol. 2, no 8, p. 1223-1228.

LIU, Ya-Ling; NASCIMENTO, Marcelle; BURNE, Robert A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. En: International journal of oral science, 2012, vol. 4, no 3, p. 135-140.

LU, Xiaonan, et al. Investigating antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*) concentrate and garlic-derived organosulfur compounds on *Campylobacter jejuni* by using Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, and electron microscopy. En: Applied and environmental microbiology, 2011, vol. 77, no 15, p. 5257-5269.

MORE G, TSHIKALANGE TE, LALL N, BOTHA F, MEYER JJ. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. En: Journal of ethnopharmacology. Octubre 2008. Vol. 119, no. 3, p. 473-7.

VAN Vuuren SF. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. En: Journal of ethnopharmacology. Octubre 2008. Vol. 119, no. 3, p. 462-72.

OJEDA-GARCÉS, Juan Carlos; OVIEDO-GARCÍA, Eliana; SALAS, Luis Andrés. Streptococcus mutans and dental caries. En: CES Odontología, 2013, vol. 26, no 1, p. 44-56.

PANTOJA, Evelyn Munayco; NAKATA, Hilda Moromi. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de Allium sativum sobre cepas estándares de la cavidad bucal. En: Odontología Sanmarquina, 2013, vol. 16, no 2, p. 21-24.

PATHIRANA, Rishi D.; O'BRIEN-SIMPSON, Neil M.; REYNOLDS, Eric C. Host immune responses to Porphyromonas gingivalis antigens. En: Periodontology 2000, 2010, vol. 52, no 1, p. 218-237.

PERFECTO, Donald Ramos; NAKATA, Hilda Moromi; CADILLO, Elba Martínez. Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. En: Odontología Sanmarquina, 2011, vol. 14, no 1, p. 34-38.

PIHLSTROM, Bruce L.; MICHALOWICZ, Bryan S.; JOHNSON, Newell W. Periodontal diseases. En: The Lancet, 2005, vol. 366, no 9499, p. 1809-1820.

RAOULT, Didier; FOTI, Bruno; ABOUDHARAM, Gérard. Historical and geographical parallelism between the incidence of dental caries, Streptococcus mutans and sugar intake. En: European journal of epidemiology, 2013, vol. 28, no 8, p. 709-10.

REYES, Ibraín Enrique Corrales. Actividad antimicrobiana y antifúngica de Allium Sativum en estomatología. En: 16 de Abril, 2014, vol. 53, no 254, p. 59-68.

REYNOSO, Victor Manuel Guerrero, et al. Epidemiología de caries dental y factores de riesgo asociados a la dentición primaria en preescolares. En: Revista de la Asociación Dental Mexicana, 2009, vol. 66, no 3, p. 10-20.

ROLÓN LARA, María Cristina; SAMUDIO, Margarita. Knowledge, attitude and practices of Pediatricians on preventive factors of oral Health in early Childhood. En: Pediatría (Asunción), 2014, vol. 41, no 3, p. 191-200.

SALAZAR ARANDA, Ricardo, et al. Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. En: Medicina universitaria, 2009, vol. 11, no 44, p. 156-164.

TELES, Ricardo, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. En: Journal of periodontology, 2010, vol. 81, no 1, p. 89-98.

VILLALOBOS, Octavio José, et al. Efecto de un enjuague bucal compuesto de aloe vera en la placa bacteriana e inflamación gingival. En: Acta odontol. venez, 2001, vol. 39, no 2, p. 16-24.